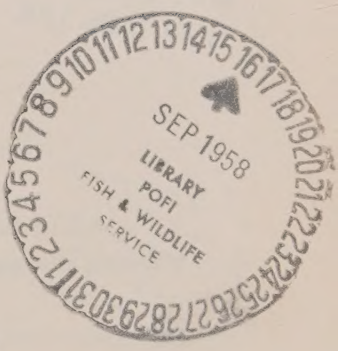
北海道大学
水産学部研究彙報

第七卷



BULLETIN
OF THE
FACULTY OF FISHERIES
HOKKAIDO UNIVERSITY

Vol. 7

1956–57

北海道大学水産学部
函館市港町

FACULTY OF FISHERIES, HOKKAIDO UNIVERSITY
HAKODATE, HOKKAIDO, JAPAN

LIBRARY
BUR. OF COMM. FISH.
HON. BIOL. LAB.

Periodical
Hokkaido univ. fac. fish. Bull.
V. 7-8
1956-58
2319 59

北海道大学水産学部研究彙報

第　七　巻

総　目　次

第　一　号　(1956年5月)

Some experiments on the variability of horizontal plankton hauls and on the horizontal distribution of plankton in a limited area ····· Masateru ANRAKU (1)

Mathematical analysis of the filtering-rate of plankton net ····· Kiichiro KOBAYASHI & Shuzo IGARASHI (17)

中層トロールに関する研究. IV. その機構と実地試験について ····· 小林喜一郎 (21)

塩辛の細菌学的研究. 第11報　細菌のL-アミノ酸酸化能と生細胞内酵素形成について ····· 故長尾　清 (31)

塩辛の細菌学的研究. 第12報　細菌の発育時に培地中に存在するGlucoseがL-アミノ酸酸化酵素形成に及ぼす影響について ····· 故長尾　清 (38)

塩辛の細菌学的研究. 第13報　細菌のL-アミノ酸酸化酵素の特異性について ····· 故長尾　清 (43)

イカの完全利用に関する研究. 第12報　夏イカ肉と秋イカ肉の分解性の差異に関する研究 ····· 谷川英一・元広輝重・石子博敏・藤井豊・谷地健二郎 (49)

第　二　号　(1956年8月)

Studies on the reproductive organs of red algae. II. On *Erythrophyllum Gmelini* (GRUN.) YENDO ····· Jun TOKIDA & Tomitarô MASAKI (63)

Diurnal rhythm of the feeding activity of goldfish in autumn and early winter ····· Hachirô HIRATA & Shinjirô KOBAYASHI (72)

On the mechanism of the appearance of the scale structure. IV. A study on the scale structure of the crucian carp, *Carassius carassius* (*L.*) ····· Saburô SAITÔ (85)

越後能生及び附近沿岸産海藻目録 ····· 斎藤　譲 (96)

塩辛の細菌学的研究. 第14報　細菌のL-アミノ酸酸化酵素系の相互転化について　故長尾　清 (109)

Bacteriological study of Shiokara or "Soused Squid". General discussion ····· Kiyoshi NAGAO (113)

Chemical studies on marine algae. X. Free and combined amino acids in marine algae ····· Mitsuzô TAKAGI (119)

Chemical studies on marine algae. XI. On the tasty ingredients of

"ASAKUSANORI", *Porphyra tenera*
..... Kiichi MURATA, Mitsuzô TAKAGI & Mitsuo KURIYAMA (130)
可溶性アルギン酸塩類に関する研究. 第1報　同一のアルギン酸に由来するリチウム，ナトリウム，カリウム，アンモニウム各塩類の粘性挙動について
..... 小黒美樹・鈴木　昇 (134)
結晶鯨 Pepsin. 第2報　溶解度曲線・元素組成・至適 pH 並に安定度について
..... 斎藤恒行・石原義雄 (147)
結晶鯨インシュリンに関する研究. 第1報　分離及び結晶化
..... 斎藤恒行・石原義雄・伊藤裕三・藤野政彦 (159)
イカ完全利用に関する研究. 第13報　スルメ製造に関する研究(其の五)　原料イカの鮮度とスルメ製品品質との関係 ..... 谷川英一・元広輝重・富田幸二 (165)
イカ完全利用に関する研究. 第14報　スルメ製造に関する研究(其の六)　スルメ製造時におけるイカ肉の乾燥度と腐敗性との関係
..... 谷川英一・長沢善雄・竹内敏夫・杉山　隆 (172)

第　三　号　(1956年11月)

On the mechanism of the appearance of the scale structure. V. The possible role of alkaline phosphatase in the formation of the teleost scale
..... Jurô YAMADA (185)
On the mechanism of the appearance of the scale structure. VI. Some observations associating with the absorption of scale in the goldfish
..... Jurô YAMADA (202)
Studies on the formation of fish eggs. IX. The fate of the yolk vesicle in the oocyte of the flounder, *Liopsetta obscura*, during vitellogenesis
..... Kiichirô YAMAMOTO (208)
ワカサギ *Hypomesus olidus* の生態学的研究. 第4報　石狩川へ遡上するワカサギの年令について ..... 浜　田　啓　吉 (213)
チカ *Hypomesus japonicus* の生態学的研究. 第1報　年令の推定 … 浜　田　啓　吉 (219)
航走採集によつて観察された 1954–1955 年津軽海峡青函航路に於ける浮游橈脚類
..... 前　田　礼　一 (225)
Report from the "Oshoro Maru" on oceanographic and biological investigations in the Bering Sea and northern North Pacific in the summer of 1955. II. Radioactivity of sea water …… Naoichi INOUE & Masaaki FUKUDA (233)
引きなわ漁船に関する航法上の研究 ..... 八反田　吉　常 (236)
水産動物筋肉中の有機燐酸化合物に関する研究. 第2報　鯉肉中の Creatine phosphate の定量に就て ..... 斎藤恒行・新井健一 (243)
The formation of magnesium–ammonium–phosphate crystals in canned sea foods. I. The conditions of the formation of crystals in canned sea foods ..... Eiichi TANIKAWA, Yoshio NAGASAWA & Takashi SUGIYAMA (247)

イカ完全利用に関する研究．第15報　スルメ製造に関する研究(其の七)　雨イカ防止に関する研究 …… 谷川英一・長沢善雄・金石和哉・杉山　隆 (252)

第　四　号 (1957年2月)

Associations of plankton diatoms around Japan as investigated by underway samplings aboard the "Oshoro Maru" in October and December 1952 …… Kôhei KAROHJI (271)

D. S. L. の研究．カムチヤツカ西海岸沖合に於ける D. S. L. に就て …… 前田辰昭・上野元一・斎藤市郎 (284)

Particulate iron in the Bering Sea …… Kenji KATO (291)

The formation of magnesium-ammonium-phosphate crystals in canned sea foods. II. Solubility of struvite formed in canned sea foods and $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ crystals synthesized in laboratory …… Eiichi TANIKAWA, Yoshio NAGASAWA & Takashi SUGIYAMA (300)

BULLETIN
OF THE
FACULTY OF FISHERIES
Vol. 7, 1956–57
No. 1, pp. 1– 61, May, 1956
No. 2, pp. 63–184, August, 1956
No. 3, pp. 185–269, November, 1956
No. 4, pp. 271–305, February, 1957

CONTENTS

ANRAKU, Masateru: Some experiments of the variability of horizontal plankton hauls and on the horizontal distribution of plankton in a limited area 1
HACHITANDA, Yoshitsune: A study of the interpretation of the steering and sailing rules for trolling vessels 236
HAMADA, Keikichi: Ecological study of the pond smelt, *Hypomesus olidus*. 4. On the age of the pond smelt ascending in the Ishikari River 213
————: Ecological study of *Hypomesus japonicus*. I. Conclusion as to age 219
HIRATA, Hachirô & KOBAYASHI, Shinjirô: Diurnal rhythm of the feeding activity of goldfish in autumn and early winter 72
INOUE, Naoichi & FUKUDA, Masaaki: Report from the "Oshoro Maru" on oceanographic and biological investigations in the Bering Sea and northern Norh Pacific in the smmer of 1955. II. Radioactivity of sea water 233
KAROHJI, Kohei: Associations of plankton diatoms around Japan as investigated by underway samplings aboard the "Oshoro Maru" in October and December 1952 271
KATO, Kenji: Particulate iron in the Bering Sea 291
KOBAYASHI, Kiichiro: An experiment on a mid-water trawl. IV. On its mechanism and a trial practice 21
———— & IGARASHI, Shuzo: Mathematical analysis of the filtering-rate of plankton net 17
MAEDA, Reiichi: Plankton copepods in the Tsugaru Straits, northern Japan, as investigated by underway samplings 225
MAEDA, Tatuaki, UENO, Motokazu & SAITO, Ichiro,: Studies on deep scattering layer. On the D. S. L. off the west coast of Kamchatka Peninsula 284
MURATA, Kiichi, TAKAGI, Mitsuzô & KURIYAMA, Mitsuo: Chemical studies on marine algae. XI. On the tasty ingredients of "ASAKUSANORI", *Porphyra tenera* 130

NAGAO, Kiyoshi: Bacteriological studies of Shiokara or "Soused squid". 11. On the activities of L-amino acid oxidizing enzymes in the isolated bacteria and the formation of the enzyme in the living cell ····· 31
————: Bacteriological studies of Shiokara or "Soused squid". 12. Influence of glucose on the formation of L-amino acid oxidizing enzymes in the isolated bacteria during growth ····· 38
————: Bacteriological studies of Shiokara or "Soused squid". 13. On the special characteristics of L-amino acid oxidizing enzymes in the isolated bacteria ····· 43
————: Bacteriological studies of Shiokara or "Soused squid". 14. On the mutual transformation of L-amino acid oxidizing enzymes in the isolated bacteria ····· 109
————: Bacteriological study of Shiokara or "Soused squid". General discussion ····· 113
OGURO, Miki & SUZUKI, Noboru: Studies on soluble alginates. I. The viscosity of the soluble alginates including lithium alginate, sodium alginate, potassium alginate and ammonium alginate ····· 134
SAITÔ, Saburô: On the mechanism of the appearance of the scale structure. IV. A study on the scale structure of the crusian carp, *Carassius carassius*. (*L.*) ····· 85
SAITÔ, Tsuneyuki & ARAI, Ken-ichi: Studies on the organic phosphate in muscle of aquatic animals. II. On the determination of creatine phosphate in muscle of carp ····· 243
———— & ISHIHARA, Yoshio: Crystalline whale pepsin. II. Solubility curve, elementary composition, opt. pH and stability ····· 147
————, ————, ITÔ, Yasuzô & FUJINO, Masahiko: Studies on crystalline whale insulin. I. Isolation and crystallization ····· 159
SAITÔ, Yuzuru: List of the marine algae from Nou, Echigo Province, and its vicinity ····· 96
TAKAGI, Mitsuzô: Chemical studies on marine algae. X. Free and combined amino acids in marine algae ····· 119
TANIKAWA, Eiichi, MOTOHIRO, Terushige & TOMITA, Kôji: Studies on the complete utilization of squid (*Ommastrephes sloani pacificus*). XIII. Relation between the freshness of raw squid and the quality of the merchandise of the dried squid ····· 165
————, MOTOHIRO, Terushige, ISHIKO, Hirotoshi, FUJII, Yutaka & YACHI, Kenjirô: Studes on the complete utilization of squid (*Ommastrephes sloani pacificus*). XII. On the difference of decomposable velocities of summer and autumn squid meat ····· 49
————, NAGASAWA, Yoshio, KANAISHI, Kazuya & SUGIYAMA, Takashi: Studies on the complete utilization of squid (*Ommastrephes sloani pacificus*).

XV. "Rained-on dried squid" ("Amaika") and methods for preventing the occurrence ····· 252
TANIKAWA, Eiichi, NAGASAWA, Yoshio & SUGIYAMA, Takashi: The formation of magnesium-ammonium-phosphate crystals in canned sea foods. I. The condition of the formation of crystals in canned sea foods ····· 247
————, ———— & ————: The formation of magnesium-ammonium-phosphate crystals in canned sea foods. II. Solubility of struvite formed in canned sea foods and $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ crystals synthesized in laboratory ····· 300
————, ————, TAKEUCHI, Toshio & SUGIYAMA, Takashi: Studies on the complete utilization of squid (*Ommastrephes sloani pacificus*). XIV. Relation between the water content of squid meat and putrefaction during the drying of squid ····· 172
TOKIDA, Jun & MASAKI, Tomitarô: Studies on the reproductive organs of red algae. II. On *Erythrophyllum Gmelini* (GRUN.) YENDO ····· 63
YAMADA, Jurô: On the mechanism of the appearararance of the scale structure. V. The possible role of alkaline phosphatase in the formation of the teleost scale ····· 185
————: On the mechanism of the appearance of the scale structure. VI. Some observation associating with the absorption of scale in the goldfish ····· 202
YAMAMOTO, Kiichirô: Studies on the formation of fish eggs. IX. The fate of the yolk vesicle in the oocyte of the flounder, *Liospetta obscura*, during vitellogenesis ····· 208

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/bulletin-fisheries-science-hokkaido_1956-1957_7

ASSOCIATIONS OF PLANKTON DIATOMS AROUND JAPAN AS INVESTIGATED BY UNDERWAY SAMPLINGS ABOARD THE "OSHORO MARU" IN OCTOBER AND DECEMBER 1952 *

Kohei KAROHJI **
Faculty of Fisheries, Hokkaido University

I. Introduction

The training ship "Oshoro Maru" of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University, made a round-Japan cruise from October 14 to December 15, 1952. The purpose of this cruise was not only for the regular training of cadets in navigation and seamanship, but also for a preliminary trial of undersea observations at several localities along the coasts of Japan Islands by means of the "Kuroshio", Undersea Observation Chamber (Inoue *et al.*, 1953) under supervision of Prof. N. Inoue, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, and Dr. T. Sasaki, Scientific Research Institute, Tokyo. On this occasion Prof. Motoda who was on board the ship made collections of the surface plankton by underway samplings through the whole course of the cruise off the coasts of Honshu and Kyushu. These samples of plankton were put at the disposal of the present author. The plankton diatoms are dealt with in the present paper.

In Japanese waters in recent years a group of planktologists in Marine Observatories, Ministry of Transportation, has contributed to understanding the nature of water masses by observing the distribution of plankton diatoms.

With similar intention the present investigations were originally undertaken to observe how the diatom associations vary with the localities around the coasts of Japan within the comparatively short period of one cruise. There are such ocean currents around Japan that were traversed in the present cruise as the Tsushima Current off Japan Sea coasts, the Kuroshiwo (Japan Current) and Oyashiwo (Kurile Current) off the Pacific coasts. The particular interest may be aroused by the manner in which varying hydrographic conditions resulting from geographical and climatic effects during continuous flow of such currents, either southwards, or northwards, are reflected in the change of diatom associations. However, the track of the ship in the present cruise did not always follow a particular ocean current; the track was located very close to the coast, passing through the purely coastal waters, in certain areas, while in other areas it was shifted comparatively to the offing, touching with the prevailing ocean current. Accordingly, the findings herewith reported render possible some considerations such as above mentioned at some places, but in most descriptions are concerned with merely the findings in respect to

*昭和27—28度文部省科学研究費（元田）一部使用
**唐牛公平

characteristics in diatom associations in various localities at that time wheresoever inshore or offshore waters.

Before going further, the author wishes to express his sincere gratitude to Prof. S. Motoda under whose guidance he initiated his scientific research work. Cordial thanks are also due to from the author to Dr. T. Kawamura and Mr. M. Anraku for their many valuable advices given throughout the laboratory work. Kind help extended by Captain T. Fujii and his crew and cadets, and Prof. N. Inoue and Dr. T. Sasaki and their scientific staff aboard the ship during that cruise is gratefully appreciated.

II. Method, Location and Date of Samplings

The Handy Underway Plankton Catcher, model I, (Motoda, 1954) was employed in sampling the plankton materials. To sample the microplankton, composed mainly of phytoplankton, while underway, a narrow conical net of fine mesh bolting silk, XX 13, *i. e.*, 129 meshes per linear inch, having approximately 0.11 mm mesh opening, is inserted into the catcher. As the catcher, model I, is very narrow, 5 cm in diameter of cylindrical case, and as it has a tapering head piece, it is easy to handle at high speed tow. The instrument was towed at the end of twenty-five meters of cotton flag line at a speed of about 9 knots for 30 minutes or less; duration of tow depended upon the circumstances.

Tows were made by cadets or sailors at intervals of four hours while the ship was sailing. The net inside was often clogged with sticky materials; on such an occasion it was washed to clean it out. The instrument was not equipped with any sinking vane, but it was supported by a heavy head piece to run through the water at about a half meter or so below the sea surface. There was no equipment such as current meter to measure the volume of water filtered by the net inside or to measure the exact distance of tow, so that the samples obtained are not available for accurately quantitative studies, but may be used for rough estimation of relative abundance of population. Of all of the samples the number of cells, often composing colonies, were counted for each species so far as identified.

Approximate location of the stations where collections were made is illustrated in Fig. 1, and more exact data on the position of the stations, date and hour of collections and temperature of the surface water at that time are given in Table 1. Total sum of the sample vials amounted to sixty-six, but that from St. 57 was lost and those from St. 35 and St. 36 did not contain any organism, but only water. These are omitted from the data.

III. Results of Observations

For the sake of convenience in arrangement descriptions will be made following the track of the ship in chronological order from departure, by grouping some of the stations on

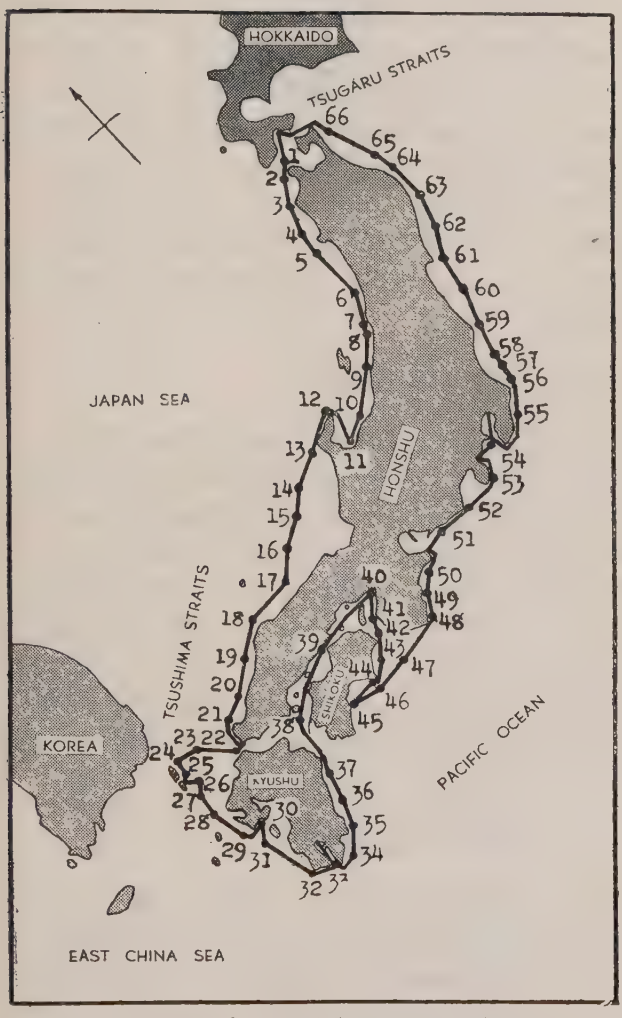


Fig. 1. Sketch map of Japan Islands showing track of the cruise and stations of sampling

the basis of neighbouring geographical situation and of apparently common associations of diatom population. Full data are given in Table 3 and summarized results in Table 2. Number of cells recorded in the text and table are only concerned with the number obtained by a tow of definite duration; all data are converted for thirty minutes' tow. It is natural that these numbers are far less than the actual number of cells which must be present in the volume of water that has been passed through the mouth opening of the instrument for such duration of tow. The filtration coefficient in such underway samplings will be much less than found in case of the use of other methods.

(1) St. 1 and 2 (Tsugaru Straits)

Cell number of total diatoms is from 3,900 (St. 1) to 25,200 (St. 2), averaging 14,550. Total species number is thirty-five. The most prevalent form is *Chaetoceros coarctatus*. This species has been known in this region as one of the representatives of tropical diatoms which appear with drift of northwards Tsushima Current from southern seas in autumn (Asamushi Marine Biological Station, 1946–49; Kokubo, 1952; Hakodate Marine Observatory, 1954). Next comes *Chaetoceros didymus* occupying about 20 % of total cells. It is a warm temperate species. The prevalence of above species indicates the inflow of a tributary current of the Tsushima Current into Tsugaru Straits in this season.

(2) St. 3-13 (Japan Sea coast of northern Honshu)

The course of the ship is located adjacent to the coast. Total cell number is counted as between 4,800 and 190,000 and 72,000 in average. Species number is eighty-four.

The leading species are *Chaetoceros coarctatus, Ch. decipiens, Ch. lorenzianus, Ch. didymus, Ch. distans, Climacodium biconcavum, C. Frauenfeldianum* and *Thalassionema nitzschioides,* though some of them are absent at some stations. *Chaetoceros coarctatus* has never occupied more than 20 % of total cells. *Hyalochaete* occupied about 50 % of total diatoms, and warm current species are found more or less commonly in the localities from Noto Peninsula to Niigata, agreeing with previous reports (Aikawa, 1936; Kawarada, 1953; Shimomura, 1954a). There are large concentrations of diatom population at St. 9 (188,400 cells) and St. 13 (179,400 cells), in which *Hyalochaete* and *Thalassionema nitzschioides* are dominant.

(3) St. 14 and 15 (Off Wakasa Bay)

These stations are located in the offing. Total cell number ranged from 7,800 (St. 14) to 32,800 (St. 15), with 20,300 in average. Number of species is twenty-one. Generally diatom population is poor both in total cell number and in species number. *Chaetoceros coarctatus* is the leading species, occupying 76 % of total diatom cells. It is followed by *Climacodium* and *Rhizosolenia.* The prevalence of tropical and subtropical oceanic species as well as the poverty in total cells indicates that the ship has passed through the water of the Tsushima Current. Shimomura (1954b) reported that the Tsushima Current off Wakasa Bay is characterized by decrease in number of plankton, particularly of phytoplankton; the more one goes to the northeast in the path of this current, the less number of plankton he finds.

(4) St. 16–21 (Japan Sea coast of southern Honshu)

Total cell number lies between 17,000 and 427,500, with 176,700 in average. Species number is sixty-seven. *Hyalochaete* occupies more than 50 % of total diatoms. *Chaetoceros lorenzianus* and *Ch. didymus* are dominant through all stations; *Ch. compressus* is dominant at St. 17–19, and *Ch. messanensis, Ch. distans,* and *Ch. radicans* are at St. 19–21. Aikawa (1936) reported that *Hyalochaete* occupies more than 50 % of total phytoplankton on southern Japan Sea coast of Honshu being followed by *Nitzschia seriata* and *Bacteriastrum* in autumn. There are high concentrations of diatom population at St. 16 (362,000 cells) and St. 19 (408,000 cells), in which *Hyalochaete* and *Thalassionema nitzschioides* are dominant. St. 16 is located near the coast of the oki Islands where the abundance of diatoms has been induced possibly by the upwelling of underwater near the islands, though physical proof is not obtained. According to Aikawa (1934), the vicinity of the oki Islands is a high productive area, and also to Shimomura (1954b), the phytoplankton is very abundant from the north of the oki Islands to the offing of Wakasa Bay. Shimomura suggested that the abundance of phytoplankton off Wakasa Bay in summer is due to the upwelling water in that region.

(5) St. 22 (Genkai-Nada)

Total cell number is very large, amounting to 1,217,400, and species number is thirty-nine. *Chaetoceros radicans* is the most prevalent species, occupying 34 % of total cells. *Ch. lorenzianus*, *Ch. compressus*, *Ch. messanensis*, *Ch. curvisetus* and *Lauderia borealis* are also important constituents of the take.

(6) St. 23 27 (Tsushima Straits)

Total cell number is between 162,000 and 273,000 per haul in the straits, while it is between 450,000 and 1,445,000 on the coast of Tsushima Island, averaging 513,000. Species number is sixty eight. *Chaetoceros decipiens*, *Ch. lorenzianus*, *Ch. didymus*, *Ch. compressus*, *Ch. curvisetus*, *Ch. radicans* and *Ch. messanensis* are dominant, being followed by *Ch. atlanticus* v. *neapolitana*, *Ch. rostratus* and *Lauderia borealis*. *Eucampia zoodiacus* is reported to be prevalent in the straits in the fourth quarter of the year (Kokubo, 1931-40, 1937), but in the present observations this species is not found in the straits, but in the Hirato Channel.

(7) St. 28 and 29 (Hirato Channel)

Total cell number is 127,200 at St. 29 and 457,800 at St. 28, averaging 292,500. Species number is fifty-four. The leading species is *Eucampia zoodiacus*, being followed by *Chaetoceros decipiens* and *Ch. lorenzianus*.

(8) St. 30 and 31 (Amakusa-Nada)

Diatoms are abundant both in total cell number and species number. Total cell number is 792,000 at St. 30 and 5,064,000 at St. 31. The latter value is the largest one among the data obtained from all stations in the present observations. Average of cell number is 2,928,000. Species number is forty one. *Skeletonema costatum* (21 %) and *Asterionella japonica* (19 %) are dominant at St. 31, while *Chaetoceros pseudocruvisetus* (34 %) and *Melosira nummuloides* (19 %) are dominant at St. 30. Next to the above four species, *Ch. curvisetus* and *Eucampia zoodiacus* are important constituents. The complicated coastal currents which might be associated with the topographic contours are possibly responsible for the high production of diatoms (cf. Aikawa, 1934).

(9) St. 32 (Southwest coast of Kyushu)

Total cell number is 2,742,000, and species number is fifty-seven. The most prevalent species is *Chaetoceros messanensis*, being followed by *Ch. compressus*, *Ch. pseudocruvisetus*, *Ch. didymus*, *Ch. radicans*, *Lauderia borealis*, *Bacteriastrum comosum* and *Rhizosolenia Stolterfothii*.

(10) St. 33 (Kagoshima Bay)

The station is located at the entrance of Kagoshima Bay. Total cell number is as large as 3,367,200, and species number is fifty-two. The components of diatoms are fairly different from those at other localities of west coast of Kyushu. *Thalassionema nitzschiodes* and *Chaetoceros pseudocruvisetus* are dominant, being followed by *Ch. compressus*, *Nitzschia seriata*, *Biddulphia sinensis*, *Hemiaulus sinensis*, *H. indica*, and *Climacodium*. *Planktoniella sol* and *Gossleriella tropica* are also found in a certain abundance. The occurrence of tropical or warm-water species is notable; the influence of the Kuroshiwo Current is apparently indicated in diatom associations at the entrance of this bay.

(11) St. 34 and 37 (Hyuga-Nada)

Diatoms are rather poor both in total cell number and in species number. Total cell number is 18,300 at St. 34 and only 2,940 at St. 37, averaging two stations 10,620 cells. Species number is twenty-nine. The leading species is *Thalassionema nitzschioides*, occupying 50 % at St. 34 and 38 % at St. 37. *Climacodium biconcavum* (18.3%) and *Melosira nummuloides* (18 %) are also important. This region is supposed to be under the influence of the Kuroshiwo Current, as is reflected in high temperature and in the prevalence of tropical diatoms as well.

(12) St. 38 (Iyo-Nada)

This station is located in the Inland Sea (Seto-Naikai). The diatom associations are distinct from those of Hyuga-Nada. Total cell number is 34,110 and species number is more than nine. *Coscinodiscus* is the most prevalent group, occupying 86 % of total cells, while *Eucampia zoodiacus* and *Hemidiscus cuneiformis* follow. Kokubo (1931 40) and Maekawa et al. (1953) reported the predominance of *Coscinodiscus* in the more western part in the Inland Sea in winter.

(13) St. 39 (Bingo-Nada)

Total cell number is 262,800 and species number is more than nineteen. *Coscinodiscus* is the most prevalent group, occupying 52 % of the total cells. In addition, the following diatoms are important constituents; *Hemidiscus cuneiformis*, *Stephanopyxis palmeriana*, *Skeletonema costatum*, *Lauderia borealis*, *Rhizosolenia Bergonii*, *Bacteriastrum hyalinum*, *B. mediterraneum*, *Ch. decipiens*, *Hemiaulus indica* and *Pleurosigma* spp. Kokubo (1934-40) reported the predominance of *Coscinodiscus* at Ohcho, Hiroshima Pref. near the present station, in early winter.

(14) St. 40 (Osaka Bay)

Total cell number is 180,000 and species number is more than twenty-four. *Thalassionema nitzschioides*, *Thalassiothrix Frauenfeldii*, and *Coscinodiscus* are dominant. The first two forms together occupy 40 %, whilst *Ch. lorenzianus*, *Ch. pseudocurvisetus*, *Eucampia zoodiacus*, *Ditylum Brightwellii* and *Rhizosolenia alata* are following.

(15) St. 41–43 (Kii Channel)

Total cell number is from 18,900 (St. 41) to 101,900 (St. 43), exceptionally rich, as large as 2,970,000 cells at St.42, and 1,017,000 in average. Species number is thirty-six. *Thalassionema nitzschicides*, *Thalassiothrix Frauenfeldii*, and *Coscinodiscus* are prevalent at St. 41 and 43; altogether the first two forms occupy above 37 %. *Chaetoceros pseudocurvisetus* is also prevalent at St. 42, occupying 67 % of the total cells. This species was reported to be a remarkable species in the inner part of Osaka Bay in December, 1952 (Ueno, 1953). The abundant diatoms at St. 42 may be associated with supply of rich nutrients from Osaka Bay which is transported to the region of St. 42 by tidal currents.

(16) St. 44 and 46 (Off Cape Muroto)

Total cell number is from 59,000 (St. 46) to 200,280 (St. 44) and 129,640 in average. Species number is forty-seven. The dominant forms are *Ch. pseudocurvisetus*, *Ch. decipiens*, *Coscinodiscus*, *Bacteriastrum*, *Thalassionema nitzschioides*, *Thalassiothrix Frauenfeldii* and *Skeletonema costatum*. The diatom associations are more or less influenced by Kuroshiwo water.

(17) St. 45 (Tosa Bay)

Total cell number is 135,240 and species number is twenty-five. *Thalassionema nitzschioides* (25 %), *Thalassiothrix Frauenfeldii* (17.5 %) and *Synedra* spp. (20 %) are dominant forms. *Chaetoceros pseudocurvisetus*, *Ch. didymus*, *Ch. atlanticus* v. *neapolitana* and *Skeletonema costatum* are also important constituents. Among these forms warm oceanic species number six and 5 % in cell number of total haul; neritic diatoms are rather prevalent, thus this sample shows neritic characters to a certain extent rather than the character of oceanic Kuroshiwo water.

(18) St. 47 (Off Kii Channel)

Diatoms are poor both in total cell number and in species number; total cell number is 8,040 and species number is nineteen. *Coscinodiscus*, *Thalassionema nitzschioides*, *Chaetoceros lorenzianus*, *Ch. decipiens*, and *Ch. coarctatus* are main constituents.

Planktoniella sol and *Gossleriella tropica* are also found. It is indicated that diatom population is fairly influenced by the Kuroshiwo Current. Characters of Kuroshiwo water as observed by diatom associations are more emphasized here than off Cape Muroto, because warm oceanic or tropical species are present to the number of 11 and occupy about 27.7 % of total cells in this station, while similar species off Cape Muroto number 12, but occupy only 5 % of total cell number.

(19) St. 48 50 (Kumano-Nada)

Diatoms are comparatively abundant in respect both to total cell number and to species number. Total cell number is between 27,500 and 333,000, averaging 224,600. Species number is fifty-one. The leading species are *Chaetoceros pseudocurvisetus* and *Skeletonema costatum*. The former species occupies above 35 % (St. 48 and 50), and the latter does 44 % (St. 49). In addition, *Ch. decipiens*, *Ch. didymus*, *Thalassionema nitzschioides* and *Nitzschia seriata* are also important forms. Marumo (1954a) reported that diatom communities were composed of *Hyalochaete*, *Rhizosolenia* and *Nitzschia seriata* in the south of Shiono-Misaki. In the present data the diatom associations off Shiono-Misaki are mainly composed of *Hyalochaete*, but show a difference from the data of Marumo (1954a) in other constituents of less importance.

(20) St. 51-57 (From Enshu-Nada to Kashima-Nada)

Total cell number is between 69,000 and 1,276,200, excluding the datum of extremely poor haul at St. 55 (2,850 cells). Average cell number is 369,000. Species number is seventy-five. The leading species are *Chaetoceros decipiens* (St. 52,53 and 56), *Skeletonema costatum* (St. 51 and 54) and *Thalassionema nitzschioides* (St. 55). In addition, *Ch. pseudocurvisetus*, *Ch. messanensis* and *Ch. didymus* are important. According to the observations of preceding workers (Marumo, 1951; Kawarada, 1954; Asaoka, 1955), *Skeletonema costatum* is more abundant near the Miura Channel than at other localities of Sagami Bay in winter when the water of Tokyo Bay, less haline than that in Sagami Bay, flows out into the present region. A large concentration of diatoms is found at St. 52. The major constituents of this concentration are *Chaetoceros decipiens*, *Ch. lorenzianus*, *Ch. didymus*, *Ch. messanensis*, *Ch. affinis*, *Ch. compressus*, *Ch. socialis*, *Skeletonema costatum* and *Thalassionema nitzschioides*. Outflow of land drainage from the Ohi River might be suggested to be responsible for the local production of diatoms at this region. *Skeletonema costatum* is very much increased at St. 51 and 54-55, indicating the spread of coastal water to these stations, but there is an indication of some influence of Kuroshiwo water at St. 55 by the occurrence of *Climacodium biconcavum* (8.6 %). On the other hand, in the region extending from St. 52 to 53 the diatom associations are represented mainly by *Chaetoceros decipiens* together with

warm-water-preferring *Hyalochaete*, as was reported by Marumo (1955) off Sanriku District, in spite of the fact that surface temperature is lower than at other stations.

(21) St. 58-60 (Pacific coast of northern Honshu)

Diatoms are considerably poor in total cell number, except the abundant population at St. 60. Total cell number is 6,060 at St. 58, below 200 at St. 59 and 143,000 at St. 60, averaging 50,000. Species number is thirty-five. In the localities of poor diatoms, *Thalassionema nitzschioides*, *Thalassiosira* sp. and *Rhizosolenia Stolterfothii* are main constituents. At. St. 60 *Chaetoceros Eibenii* is the most prevalent species, occupying more than a half of the diatom population, being followed by *Ch. coarctatus*, *Ch. pseudocurvisetus*, *Thalassiosira* sp., *Lauderia borealis* and *Ditylum Brightwellii*. Surface temperature falls northwards from 17.1°C at St. 58 to 14.2°C at St. 60 and 15.6°C in average. This temperature is similar to that of the area of the mixing of Kuroshiwo and Oyashiwo waters as reported by Shimomura (1953) in December. From diatom associations this region is considered to be a transitional region from warm Kuroshiwo water to the mixing area at the north of Kinkazan.

(22) St. 61-66 (Pacific coast of more northern Honshu)

Diatoms are poor in total cell number which ranges between 12,500 and 33,000, averaging 20,700. Species number is forty-one. Predominant species are *Coscinodiscus granii*, *C. wailesii*, *Thalassionema nitzschioides*, and *Chaetoceros affinis*. In addition, *Biddulphia sinensis*, *Hemidiscus cuneiformis*, *Stephanopyxis palmeriana* are also important constituents. *Chaetoceros*, *Thalassionema nitzschioides* and *Coscinodiscus* spp. have been reported as important components of diatoms in the Oyashiwo water in this region (Marumo, 1954b, 1955; Shimomura, 1953). *Chaetoceros socialis* and *Ch. debilis* are also important species to which is owed the high abundance of diatoms (Shimomura, 1953). In the present observations, *Chaetoceros* occupies from 13.3 to 37 % of total cells, increasing northwards. Associated species are commonly *Chaetoceros affinis*, *Ch. decipiens* and *Ch. didymus*, and in some localities *Ch. socialis*, *Ch. debilis*, and *Ch. convolutus*. However, *Chaetoceros* species which belong either to *Phaeoceros* or *Hyalochaete*, that have been reported as characteristic indicators of the Oyashiwo Current are rare in the present data. On the contrary, *Coscinodiscus* decreases in number northwards from 42.2 to 3 %. *Thalassionema nitzschioides* is remarkably dominant at St. 66, occupying more than a half of the diatom population. It is noticed that at St. 63 *Hemidiscus cuneiformis*, *Biddulphia sineisis* and *Stephanopyxis palmeriana* occupy a considerably higher portion of the population than in other localities, and also *Corethron hystrix* (11.5 %), *Ditylum Brightwellii* and *Thalassiosira* sp. occur rather often. Tamura (1951) reported similar diatom associations to the present data from Tsugaru Straits in

January, 1951.

In the present cruise the stations are located close to the coast, so that diatom associations may have been influenced by neritic waters, and, in addition, the influence of southwards warm Tsugaru Current (a tributary of Tsushima Current) from Tsugaru Straits flowing in the comparatively inshore area and that of northwards cold Oyashiwo Current in the offing are mixed to a certain extent, exerting influence upon the associations of diatoms in the present stations.

IV. Discussion

It is still a perplexed matter to decide what plankton forms should be selected for indicating what nature of water, though accumulated works have contributed to generalize the ecological situation of the various forms in relation to the environmental characteristics, especially to the temperature of habitat, and in less completeness to the salinity.

Ocean currents may be evidently traced by the existence of most intolerant oceanic species which are transported by the current from their original propagative area. However, strictly intolerant forms, if they occur, are usually present in very small number out of their birth place; in most cases their presence or absence is only recorded, and the difficulty in accurate numerical expression is often involved. On the other hand, there is no evidenece, in phytoplanktons, that they do not reproduce in favorable circumstances wherescever during their drift, so that even though a large concentration of such forms is found in some locality out of their original area, it does not necessarily indicate the prevalence of the current itself in this locality.

It is known that the characterization of plankton associations obtained from one place cannot be adopted for other localities; a species associating with a particular nature of water does not always do so in water of similar nature in other regions. It is natural that, for instance, some of the neritic species which widely inhabit the tropics or subtropics might be drifted with the current toward a high latitude with resistance to the changing environments; thus they would become apparent indicators of oceanic warm current in high latitude. *Chaetoceros lorenzianus* and *Ch. distans* are such forms which are considered to be indicators of the Tsushima Current in northern Japan. Such regionality of plankton characteristics forces planktologists to make more efforts in charting the characteristic associations at various localities in various seasons in as great detail as possible.

The greatest usefulness of plankton indication of water masses would be involved in the ascertainment of mixing rate of two or more water masses of different nature, *e. g.*, oceanic and neritic water, or warm and cold current, with an accuracy that physical, or even chemical, determination would not be able to manifest.

Many preceding workers have presented accounts of diatom associations on the coast and in the offing of Japan, discussing their characteristics which apparently associate with the water masses in which they are distributed. However, differences in times and

positions of samplings from the present observations, though in some cases to a very slight extent, make it difficult to make reference to the earlier reports or comparison with them. So far as possible to summarize the present data the knowledge accumulated by the many preceding authors is adopted for classifying the plankton forms into warm or cold and oceanic or neritic preference, though some should be valued as tentative decisions.

In the present observations, the track of the ship along the Japan Sea coast of Honshu was populated by such tropical or subtropical species as *Chaetoceros coarctatus*, *Climacodium Frauenfeldianum* and *C. beconcavum*. Even in the region near the coast, tropical diatoms such as *Chaetoceros diversus*, *Ch. paradoxum* and *Ch. messanensis* were prevalent. Along the track on the coast of Kyushu neritic species, viz., *Skeletonema costatum*, *Asterionella japonica* and *Eucampia zoodiacus* were most prevalent forms among the population. *Thalassionema nitzschioides* was widely distributed covering the area from Osaka Bay to Kii Channel. *Skeletonema costatum* which is known as a wide spread species and as making remarkable increase in certain neritic conditions occurred in large number on the Pacific coast from Kii Peninsula to Boso Peninsula. *Climacodium biconcavum* was found frequently in certain areas of the Pacific coast reflecting the presence of Kuroshiwo water. In such area the total cells were comparatively decreased. The area in which predominance of *Chaetoceros pseudocurvisetus* was found was also considered to be bathed with Kuroshiwo water. In the coastal region of the Pacific side occurrence of *Planktoniella sol*, *Cossleriella tropica*, *Guinardia flaccida*, *Hemiaulus indica*, *Chaetoceros coarctatus* and *Ch. atlanticus* v. *neapolitana*, though in comparatively small number, indicated that there the water was mixed with Kuroshiwo water to a certain extent. The diatom population off Cape Omae-Zaki (St. 52) was composed of *Chaetoceros decipiens* and warm-water-preferring *Hyalochaete*. This probably reflects the effects of lowering temperature. On the northern coast of Honshu on the Pacific side the track of the ship covered a region of coastal water embodying the *Chaeto*-plankton, but the flow of Oyashiwo is reflected in the occurrence of cold-water-preferring *Hyalochaete*, such as *Chaetoceros decipiens*, *Ch. debilis*, *Ch. socialis*, *Ch. convolutus* and *Corethron hystrix*. The prevalence of *Chaetoceros Eibenii* at St. 60 suggested that there is mixing of the Oyashiwo water with the Kuroshiwo water.

V. Summary

The materials of diatoms were collected by underway samplings aboard the "Oshoro Maru" during her round-Japan cruise from October 14 to December 15, 1952.

Diatom associations in neritic region along Japan Sea coast are mainly composed of *Chaeto*-plankton; warm-water *Hyalochaete*, *Rhizosolenia* and *Thalassionema nitzschioides*, while in the offings *Chaetoceros coarctatus* and *Climacodium* are prevalent, though the above mentioned neritic forms are also included.

On the northwest coast of Kyushu, *Eucampia zoodiacus* and *Hyalochaete* are predominant, and on the west coast, such neritic diatoms as *Skeletonema costatum*, *Asterionella japonica* and warm-water *Hyalochaete* are abundantly collected.

In Kagoshima Bay on the south coast of Kyushu, warm-water *Hyalochaete* and *Thalassionema* are dominant, and other forms even more preferring warm-water are found, indicating the direct influence of the Kuroshiwo Current.

Diatom associations in the Inland Sea are different from those in other localities; *Coscinodiscus* is prevalent, occupying half or more of total diatom population.

Thalassionema nitzschioides, *Thalassiothrix Frauenfeldii* and *Coscinodiscus* are dominant in the area from Osaka Bay to Kii Channel; in addition, *Chaetoceros pseudocurvisetus* is abundantly distributed off Wakayama.

From off Cape Muroto to Tosa Bay, the above forms also occurred prevalently, and in addition, several other warm-water diatoms are found together, indicating the influence of Kuroshiwo water.

Characteristic Kuroshiwo diatoms, *e. g.*, warm-water *Hyalochaete* and other several tropical forms, prevail in the offing of Kii Channel, but *Chaetoceros decipiens* is also there abundantly included.

Skeletonema costatum and *Ch. pseudocurvisetus* and other neritic diatoms are dominant on the east coast of the Kii Peninsula.

Either *Skeletonema costatum* or *Hyalochaete* and *Ch. decipiens* are leading forms in the area extending from Enshu-Nada to Kashima-Nada; the former may be the indicator species of prevalent coastal water.

On the Pacific coast of northern Honshu, *Chaetoceros Eibenii* and other *Chaetoceros* spp. are dominant to the south of Kinkazan, but in other localities, diatoms are extremely poor, represented by such forms as *Thalassionema nitzschioides*, *Rhizosolenia* and *Thalassiosira*.

On the more northern coast of Honshu, *Coscinodiscus*, *Thalassionema*, *Chaetoceros affinis*, and *Ch. decipiens* are dominant. Only a few cold species of *Hyalochaete* and *Coscinodiscus* are collected there.

Literature cited

Aikawa. H. (1934). On the quantitative analyses of plankton associations in the seas surrounding Japan II. *Jour. Imp. Fish. Sta.* (5), 236-272. (in Japanese).

———— (1936). A quantitative analysis of the plankton associations in the adjacent seas of Japan IV. *Ibid.* (7), 153-182. (in Japanese).

Asamushi Marine Biological Station (1946-49). *Bulletin of the Marine Biological Station of Asamushi.* (in Japanese).

Asaoka, O. (1955). On the variations of the conditions of plankton diatoms and the sea at a pier, Jogashima Island, in the period from March 1952 to May 1953. *Jour. Oceanogr. Soc. Japan* 11

(12), 1-6. (in Japanese).

Hakodate Marine Observatory (1954). *Ten-day marine and meteorological report of the Hakodate Marine Observatory.*

Inoue, N., Sasaki T. & Oaki, R. (1953). "Kuroshio" Undersea Observation Chamber. *Rec. Oceanogr. Wks. Japan, N. S.* 1 (1), 52-62. (in Japanese).

Kawarada, Y. (1953). On the plankton associations in Japan Sea. *Jour. Oceanogr. Soc. Japan* 9 (2), 1-8. (in Japanese).

———— (1954). On the seasonal variations of the microplankton at Jogashima Island. *Oceanogr. Rep. Centr. Meteor. Obs.* 3 (4), 29-34. (in Japanese).

Kokubo, S. (1931-40). Plankton-jihô. nos. 1-15. *The National Research Council of Japan.* (in Japanese).

———— (1952). Results of the observations on the plankton and oceanography of Mutsu Bay during 1950. *Bull Mar. Biol. Sta. Asamushi* 5 (1), 1-54.

Maekawa, K., Inoue, T., Utsunomiya, T., Yanai, T., Chiba, T. & Tsuruta, T. (1953). On the seasonal change of oceanographical conditions and the plankton in Suho-Nada. *Yamaguchi-ken Naikai Suisanshikenjo Chosa Kenkyu Gyoseki* 5 (1), 73-83. (in Japanese).

Marumo, R. (1951). On the planktological conditions of Sagami Bay, from September, 1947 to July, 1948. *Oceanogr. Rep. Centr. Meteor. Obs.* 2 (1), 25-32. (in Japanese).

———— (1954a). Diatom plankton in the south of Cape Shionomisaki in 1953. *Oceanogr. Mag. Centr. Meteor. Obs.* 6 (3), 145-182.

———— (1954b). Relation between planktological and oceanographical conditions of a sea area east of Kinkazan in winter. *Jour. Oceanogr. Soc. Japan* 10 (2), 77-84. (in Japanese).

———— (1955). Marine diatoms of the east coast of northern Japan in winter from 1953 to 1954. *Oceanogr. Mag. Centr. Meteor. Obs.* 6 (4), 164-173.

Motoda, S. (1954). Handy Underway Plankton Catchers. *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.* 5 (2), 149-152.

Shimomura, T. (1953). A study of the production and distribution of the microplankton and their relation to oceanographical conditions II. *Bull. Japan Sea Reg. Fish. Res. Lab.* (1), 1-120. (in Japanese).

———— (1954a). Planktological studies on the warm Tsushima Current region I. *Ann. Rep. Japan Sea Reg. Fish. Res. Lab.* (1), 1-138.

———— (1954b). Planktological studies on the warm Tsushima Current region II. *Ibid.* (1), 139-152.

Tamura, T. (1951). On the seasonal change of the planktons making their appearance in the vicinity of Funka-Bay. *Sci. Papers Hokkaido Fish. Sci. Inst.* (8), 26-38. (in Japanese).

Ueno, F. (1953). Report of the plankton collected by R. M. S. Shumpu Maru in Osaka-Wan (Regular monthly collection) Jan.-Dec., 1952. *Kobe Mar. Obs.* (Mimeogr. in Japanese).

D. S. L. の 研 究

カムチヤツカ西海岸沖合に於る D. S. L. に就て

前 田 辰 昭・上 野 元 一・斎 藤 市 郎
（北海道大学水産学部遠洋漁業学教室）

Studies on Deep Scattering Layer

On the D. S. L. off the west coast of Kamchatka Peninsula

Tatuaki MAEDA Motokazu UENO and Ichiro SAITO,

Abstract

The authors have been surveying the cause of D. S. L. and its influence upon the salmon fishing off the west coast of Kamchatka Peninsula in July and August 1955.

As the result of the above survey, D. S. L. has been proven to be formed near surface by the thermocline of water temperature and the presence of plankton community, though such a statement can not yet be made with probability in regards to the deep layer.

On the other hand, it was found that D. S. L. formation near surface has close relationship upon the migration of salmon and trout judging from the catch unit per net in fishing experiment.

In conclusion, the formation of D. S. L. is suggested to be one of the leading factors which should determine the setting position of draft net in the effort clarify the significance of D. S. L.

I. 緒　　言

最近音響測深機（魚群探知機）に現れる D. S. L.（Deep Scattering Layer）の研究は，各方面に於て行われているが，筆者等は D. S. L. の成因及び漁業との関係に就て研究を続けて来た。そして1955年7月1日より同年8月20日迄の間カムチヤツカ西海岸沖合に於て，鮭鱒の漁場調査を行つた。その際同海域のオゼルナヤ沖合に於て海洋観測と並行して音響測深機による D. S. L. の探知を試みたところ，屢々顕著な D. S. L. を発見した。本研究は，其際に捉えた D. S. L. の成因について述べると共に，鮭鱒の漁業試験を行つたので，その結果をも併せて検討する。

II. 使用船舶機械器具及び漁網

1. 船　舶

水産庁調査船第15みなと丸，74.85屯，ヂーゼル機関250馬力

2. 調査に使用した機械器具

(1) 記録式音響測深機（魚群探知機）	古野電気株式会社製，K261型，14K.C.
(2) 手動測深機	鶴見精機製，ケルビン式
(3) B. T.（Bathy-thermograph）	0～270m迄測温可能
(4) 転倒寒暖計及び採水器	ナンゼン式

3. 漁　網（流網）

函館製網船具株式会社製，アミラン漁網，4.3寸目，200反

III. D.S.L. の観察

D.S.L. の観測海域は，Fig.1に示す如く，カムチヤツカ西海岸のオゼルナヤ沖合及び阿頼度島周辺であつた。

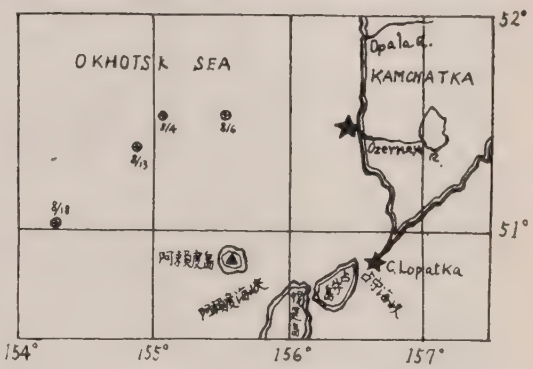


Fig. 1　D.S.L. 観測位置図

1.　8月4日の観察

図版I，2は Lat. 51°-30′N, Long. 155°-06′E（E点）に於て音響測深機によつて捉えたD.S.L.の記録であるが，このD.S.L.はD点30～40m層に現われ，次第に表面に接近し，E点に於て15m附近にみられたものの一部である（Fig.2）。この時の海況はFig.2の如くで，表面水温の分布からすると，冷水帯はB地点方向よりE点に向つて流れている事がわかる。また水色及び透明度は図示の通りで，透明度の低く濁つた水帯がB点よりE点方向に流れ，表面水温と同様の結果がみられた。

次にB.T.を使用して深度と水温との関係について調べたところ，Fig.3, Fig.4, Fig.5の如くで，Fig.4（D点）及びFig.5（E点）では共に水温の躍層が認められた。

以上の観測結果から，D点及びE点で捉えたD.S.L.の成因について考察するに，この附近海域は透明度の低く濁つた冷水帯があつて，B点よりE点に向つて強く押しており，その周辺には澄んだ温暖な水帯があつて，D及びE点の間で汐目を形成していた。そのためD及びE点との間では海況の変化があり，水温については西側のD点が高く，E点は低くなつていた。またD点の海水は澄んで透明度も10mであつたのに対し，E点では濁つて透明度は7mを示していた（Fig.2）。これらの事から，D及びE点との間では，澄んだ温暖な水帯が西側から冷水帯の上層を覆つていた事が想像される。次にFig.4（D点）に於てみられた30～40mの躍層及びFig.5（E点）に於ける表層附近の躍層は，両水帯の接触によつて生じ，この躍層がD.S.L.の成因をなしているものと考えられ，従つて図版I，2のD.S.L.はFig.5の躍層によるものと推察されるのである。

このD.S.L.は直接的には水温の躍層によつて生じたものと思うが，間接的には異つた水帯の接触，即ち潮目が原因をなしているもので，橋本氏等の述べているように[1]水色及び透明度の変化とも関係を有していると云い得るのである。

2.　8月6日の観察

図版I，1は Lat. 51°-32′N, Leng. 155°-37′E 附近に於て捉えたD.S.L.の記録であるが，表層と深層とに現れている。A，B，C点（図版I，1; Fig.6）のB.T.による水温の垂直分布は図示の通りである（Fig.7, Fig.8, Fig.9）。そしてA，B，C点を通じてみられる表層5～20mの D.S.L.は既述の如く躍層に関係あることが分る。またA点に於て120～130m層に現れたD.S.L.はB点に至つて60m層となり，次第に浅層にみられ，C点に於ては表面に達している。深層のD.S.L.は浅層の場合の如く，必ずしも躍層とは関係ないようで，B及びC点では，D.S.L. の出現水深に躍層が観測されたが，A点の120～130m層には躍層は全くみられなかつた。この原因を究明してみるに，SEよりNWの方向に張り出している冷水帯の末端がC点を通る9°C水帯を境としているようで，そのSE方向は水色6，透明度7mであつたものが9.5°Cの水域に至つて水色4，透明度10mに変化している（Fig.6），即ち透明度の低い濁つた寒冷水が透明度の高い澄んだ水帯の上層にSEからNWに向つて流れ，A点で120～130m，B点で55～65m，C点では表面に達しており，A点に現れた120～130m層のD.S.L.はこの温暖水と寒冷水との接触に起因するものと考えられ，橋本等[2]の云う異つた海流の接触面により生ずる塩分の密度差，比重差，プランクトン等によつて出来た現象と思考されるのである。

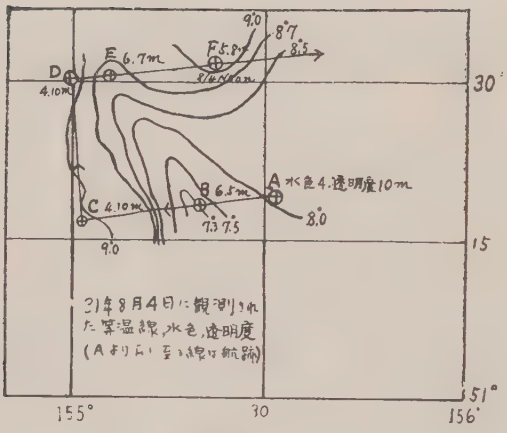


Fig. 2

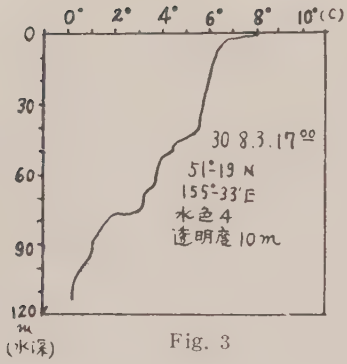


Fig. 3

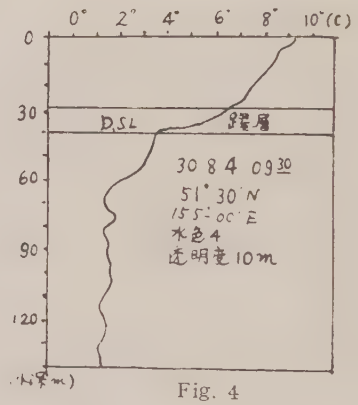


Fig. 4

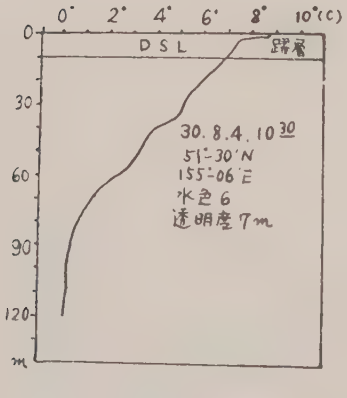


Fig. 5

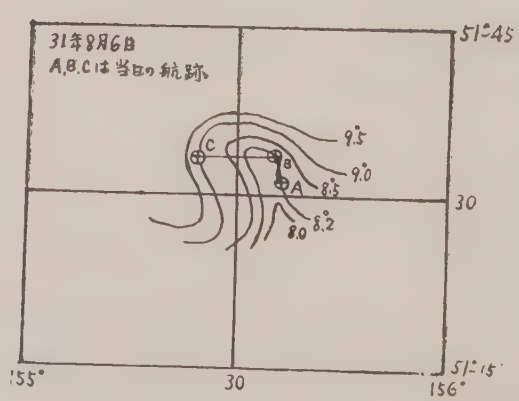


Fig. 6

Fig. 2　8月4日の表面水温，水色，透明度の分布
Fig. 3　Fig. 2 A点の水温垂直分布（B. T. による）
Fig. 4　Fig. 2 D点の水温垂直分布と D. S. L. の分布（B. T. による）
Fig. 5　Fig. 2 E点の水温垂直分布と D. S. L. の分布（B. T. による）
Fig. 6　8月6日の表面水温分布

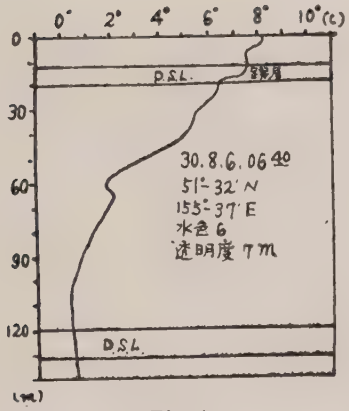


Fig. 7

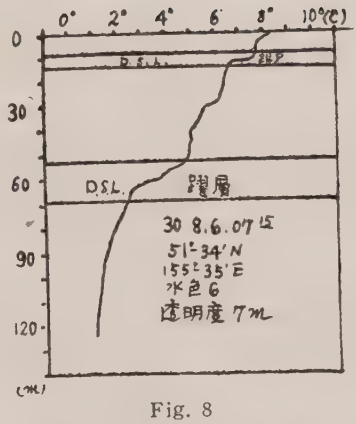


Fig. 8

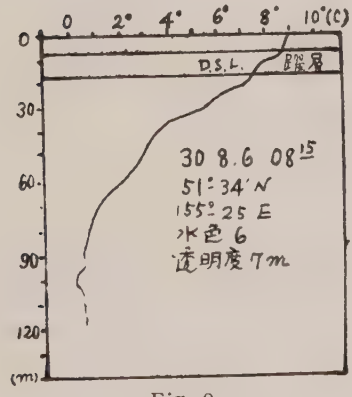


Fig. 9

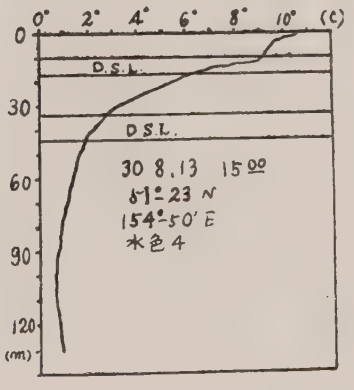


Fig. 10

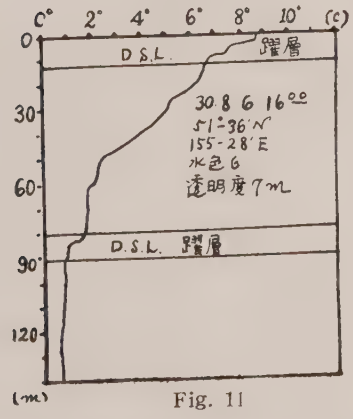


Fig. 11

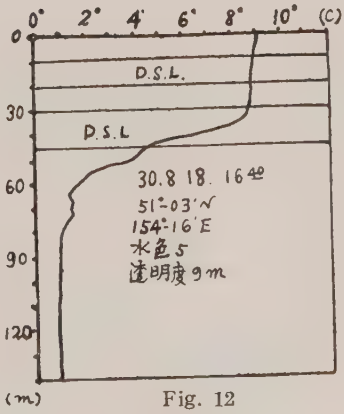


Fig. 12

Fig. 7　図版Ⅰ，1及びFig. 6 A点の水溫垂直分布とD. S. L.の分布（B. T.による）
Fig. 8　図版Ⅰ，1及びFig. 6 B点の水溫垂直分布とD. S. L.の分布（B. T.による）
Fig. 9　図版Ⅰ，1及びFig. 6 C点の水溫垂直分布とD. S. L.の分布（B. T.による）
Fig.10　図版Ⅰ，3 A点の水溫垂直分布とD. S. L.の分布（B. T.による）
Fig.11　図版Ⅰ，6 B点の水溫垂直分布とD. S. L.の分布（B. T.による）
Fig.12　図版Ⅰ，4の水溫垂直分布とD. S. L.の分布（B. T.による）

3. 8月13日の観察

図版Ⅰ, 3 は Lat. 51°-23′N, Long. 154°-50′E（A点）附近に於てみられた D. S. L. の記録である。この観測時の海水は全般的に澄んでいて，前述のような透明度の低い濁つた水帯は発見出来なかつたが，この北側には，極めて顕著な潮目が認められた。東から西に向つて航走しながら測定した D. S. L. の出現層は変化なく，南北に対しては北側に於て浅く，南側では深層に現れていた（図版Ⅰ, 3）。水温の垂直分布（Fig. 10）では，10～15mに躍層がみられ，この躍層が D. S. L. として現れたものと考えられ，更にこの表面附近にはプランクトン（*Euphausia pacifica*）の濃密な群が認められた。また40m層に記録された D. S. L. は，躍層によつて生じたものではなく，図版Ⅰ, 1 A点の120～130m層の時と同様に，異つた水帯の接触によつてできたものと推察される。

以上の結果を要約すると，D. S. L. は主として潮目に出現し，特に水温の躍層及びプランクトンの発生している水域に多くみられることがわかる。然し D. S. L. は，出現水深の深浅によつて多少その現象を異にし，表層 0～50m附近では，多くの場合躍層を有し，時には濃密なプランクトンの群が認められる。これに対し深層の 50～160mに現れる D. S. L. は，躍層とは無関係な場合もあり，原因は明確ではないがその時の海況から判断して異つた水帯の接触に起因するものと考えられ，従つて塩分，比重，酸素量，プランクトン量等の相違によつて生ずるものと推察されるのである。

Ⅳ. D. S. L. と鮭鱒の漁獲との関係について

カムチャツカ西海岸沖合に於ける D. S. L. の成因に就いての考察は，前に述べたので，こゝでは漁獲試験の結果をもとゝして D. S. L. と鮭鱒漁業との関係に就いて述べてみたいと思う。

1. 8月6日揚網時の観察

図版Ⅰ, 5 は8月6日の揚網時に現れた D. S. L. の記録である。図に於てA点では深度33mに D. S. L. がみられ，NW方向に進むに従つて表層に接近し，B点では殆んど表面に達し，出現層も大きく，所々に魚群記録もみられた。この時の漁獲成績は下記の通りである。

使用網数……120反　　網地及び目合……アミラン4.3寸目

漁獲尾数……1102尾（マス46%）　　流網率……9.2尾

この時 D. S. L. 出現深度と流網率の関係を調査したところ，D. S. L. の深部に現れていた南側では，51反揚網して流網率6.0尾，A点附近（50～30m）では51反で9.9尾，更に D. S. L. の表層近くに現れたB点附近は，18反の揚網によつて15.9尾の流網率を得た。この結果によると，D. S. L. の出現深度と鮭鱒の流網率との関係は，逆比例しており，深度の大なる南側では流網率悪く，表層に現れた北側（B点附近）では流網率は良好であつた。尚B点附近の南側には透明度の低い濁つた水帯があつたが，この北側には澄んだ透明度の高い水帯が認められ，更にその附近海域には水泡，コンブ類，木片，その他の漂流物が多く，顕著な潮目を形成していた。

2. 8月6日投網による試験

図版Ⅰ, 6 は Lat. 51°-37′N, Long. 155°-25′E に於て D. S. L. を捉え，この地点よりＥＳＥ方向に投網しながら記録したものである。この漁獲試験では160反使用して流網率6.6尾を得た。B点に於ける D. S. L. は，表層附近及び深層の88m附近にみられ，その水深に於ては共に躍層が観測された（Fig. 11）。図版Ⅰ, 6 のA点及びB点の流網状況を調査したところ，深層の D. S. L. が表面に接近していたA点附近では，表層の D. S. L. はB点附近に比べ密で，魚群も多く記録され流網率も良好であつた。

3. 8月18日投網による試験

Lat. 51°-03′N, Long. 154°-16′E に於て D. S. L. をみとめ，漁獲試験を行つた。図版Ⅰ, 4 は当日投網した際の音響測深機による記録である。この水深40m附近の D. S. L. は躍層によるものであるが（Fig. 12），表層のものには躍層は観測されず，プランクトンが成因をなしていたのではないかと考えられ，鮭鱒群は表層

のD.S.L.附近に多く記録されていた。漁獲成績は，銀鮭を主とし1913尾（176反使用）を漁獲し，罹網率10.9尾の好成績を得た。この漁獲成績は，D.S.L.の記録されない水域での漁獲率4～5尾程度に比べ著るしく高いものであつた。

以上三例を引用したのであるが，本試験期間中には前記の外に，しばしばD.S.L.と鮭鱒の漁獲との関係を観察した。その結果よりすれば，D.S.L.は潮目を形成している海域に現れる場合が多く，従つて該海域には，鮭鱒の餌料となるプランクトンの発生も多く，これに伴い鮭鱒の来游量は増加する。それ故D.S.L.と鮭鱒は密接な関係を有しているものと推察されるのである。

次にカムチヤツカ西海岸沖合に於ける鮭鱒の游泳層は，時刻，気象状況その他により異るものと思うが，音響測深機の記録（図版Ⅰ，2～6）によつて観察すると，概ね水深40mを限界としその以浅に多く，特に20m附近に密集した群がみられた。そのため鮭鱒に最も関係を持つD.S.L.の出現層は，40m以浅と思考される。

尚筆者等はD.S.L.を探知し，鮭鱒流網の操業位置を選定するのに次の方法を採用し，好結果を得たので次に述べてみたいと思う。即ち漁場に於て音響測深機を使用してD.S.L.の捕捉に努め，D.S.L.を発見し，出現層が深部より表面に接近する方向，換言すれば浅く記録される方向に航走し，D.S.L.が40m層以浅，出来得れば表層附近に現れている海域を選んで操業位置とする。このようにして漁獲率を揚げたのである。また操業位置決定に際しては，従来採用されている漁場の表面水温分布を調査し，等温線が密でしかもポケット状をなしている水域を選ぶ事により，尚一層の効果をあげ得るのである。

V. 結　言

本研究は，カムチヤツカ西海岸沖合に於て捉えたD.S.L.について，その成因の一端を究明し，更に鮭鱒漁業との関係について述べたのであるが，調査期間が短かく，且つ，観測器具の不備等のため充分な結果は得られなかつた。然しすでに述べた如く，D.S.L.と鮭鱒漁業との関連性を知り得たので，今後引続き此種の研究を進め，合理的な操業位置の選定に資したいと思う。

終りにあたり，本研究の端緒を与え，更に現地に於て種々御指導，御便宜を与えられた水産庁桝内主席監督官，並びに同山平，高橋両監督官に対し，深甚の謝意を表すると共に，本調査期間中終始御協力下さつた第15みなと丸関橋喜一郎船長以下乗組員一同に対し，衷心より感謝する次第である。

引　用　文　献

1）橋本富寿・間庭愛信（1956）．北洋鮭鱒漁場における魚群探知実験．漁船研究技報，第8号．
2）橋本富寿・間庭愛信（1954）．D.S.L.の超音波伝播特性に及ぼす影響に関する研究．漁船研究技報，第5号．

図版 I の説明

1. 8月6日捉えた D. S. L. の記録
2. 8月4日捉えた D. S. L. の記録
3. 8月13日捉えた D. S. L. の記録
4. 8月18日投網時に捉えた D. S. L. の記録
5. 8月6日揚網時に捉えた D. S. L. の記録
6. 8月6日投網時に捉えた D. S. L. の記録

PARTICULATE IRON IN THE BERING SEA *

Kenji KATO
Faculty of Fisheries, Hokkaido University

Introduction

The iron in marine water occurs in various forms. It is essential for all plants and animals. Cooper (1948a) catalogued a number of forms of iron contained in sea water, but is difficult to assay quantitatively more than two forms, the soluble and the particultate, where the distinction between them is arbitrarily dependent upon the porosity of the filter utilized for the separation. The greater portion of the iron in marine water may be in colloidal or other particulate forms, inasmuch as the solubility of ferric and ferrous hydroxides will allow but 0.5γ/L of iron exists as ionic species. As demonstrated by many investigators (Cooper, 1935; Thompson & Bremner, 1935; Rakestraw, Mancke & Beach, 1936), the distribution of iron in the sea seems usually very erratic. Lewis and Goldberg (1954) have pointed out the fact that the so-called soluble iron is quite uniformally dispersed throughout the oceans. Accordingly the erratic distribution of iron in the sea must be attributed to the random distribution of relatively large particles of iron compounds in suspension.

The particulate iron in marine water plays an important rôle in biogeochemical cycle in the ocean (Gran, 1933). Harvey (1937) has demonstrated that diatoms are able to assimilate ferric hydroxide or ferric phosphate in colloidal or particulate forms and to utilize it in their growth. Furthermore Goldberg (1952) observed that the marine diatom *Asterionella japenica* utilzed only particulate and/or colloidal iron as growth nutrient whereas ionically complex ferric iron as the citrate, ascorbate or artificial humate was not available for uptake. On the other hand, Goldberg (1954) considered the ability of the hydrated oxides of iron and manganese to adsorb ions from solution (*SCAVENGING*) in relation to some problems in marine sciences, and demonstrated that the distribution of some ionic species is influenced by their adsorbability by particulate iron and manganese oxides.

Few available data have ever been published on the distribution of iron, especially in the particulate form, in the pelagic waters of the North Pacific and the Bering Sea (Thompson & Bremner, 1935; Lewis & Goldberg, 1954), notwithstanding the important significance of the particulate iron in the field of the biogeochemistry of the ocean. Oceanochemical investigation of the particulate iron in the water of the Bering was undertaken by the author and his collaborators, in the summer of 1955, when on board the training ship "Oshoro-Maru" (617 tons) of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University.

* Report from the "Oshoro-Maru" on oceanographic and biological investigations in the Bering Sea and Northern North Pacific in the summer of 1955. III. おしよろ丸北洋調査報告 No. 6 (1955年度)

This cruise of the "Oshoro-Maru" had been planned for participating in the North Pacific Oceanographic Expedition (NORPAC Expedition) coordinated by the oceanographic institutions of Japan, Canada and the United States. The "Oshoro Maru" Expedition (Motoda & Fujii, 1956) in the summer of 1955 was conducted by Prof. Shigeru Motoda and a group of scientists from the Faculty engaged directly in research work connected with their specific interests.

The "Oshoro-Maru" departed from Hakodate on June 21, 1955, cruising northward, and arrived at the first station of the Expedition off the south-eastern coast of Kamchatka on June 26. The hydrographic casts and plankton sampling as well as gill-net operation were begun from this day. The routine observations were finished at the thirty-seventh station in the southwest of the Gulf of Alaska on the 21th of July. The problems of particulate iron in the water were studied using samples taken at the seven stations which are indicated in Figure 1 and summarized in Table 1.

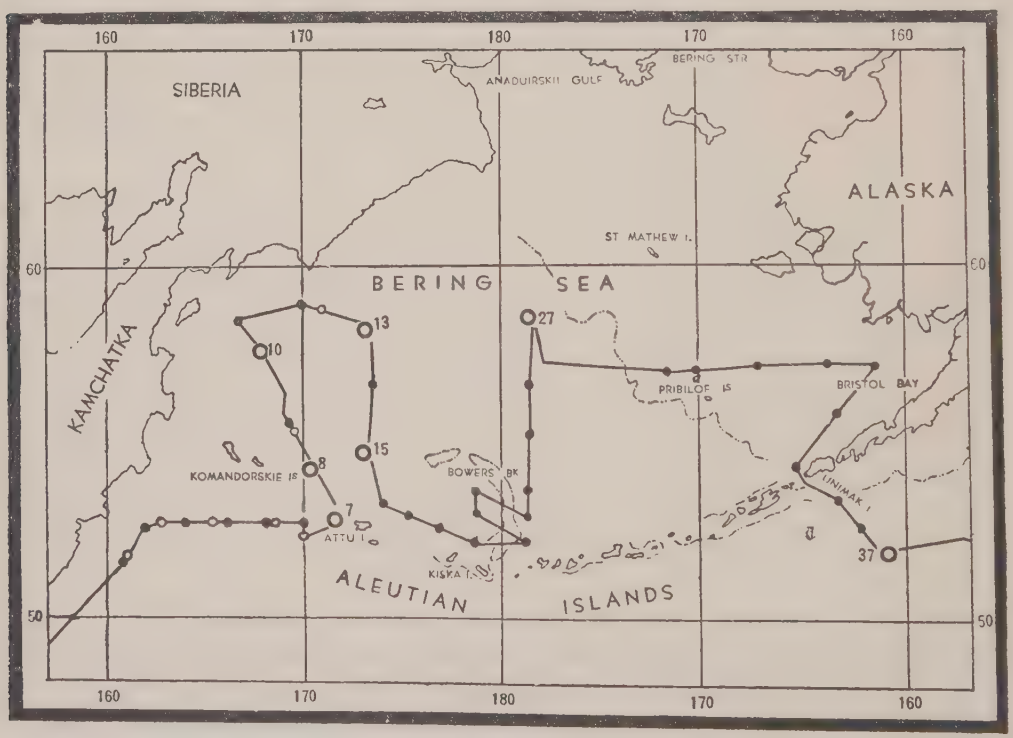


Fig 1. Observation station on the OSHORO-MARU EXPEDITION in the summer of 1955

Experimental

1. Collection and Pretreatment of Water Samples

Measured sample of 500 ml (or 250 ml) sea water, collected in Nansen bottles, was passed through a molecular filter. The filter was dried in the dryer equipped with two

ultra-red lamps for about ten minutes until quite dry, put into a polyethylene envelope and sealed by heating for preservation without external contamination. The sealed filters were brought to the laboratory of the Faculty of Fisheries of the University and subjected to chemical determination.

The molecular filter utilized in the present investigaton was "Membranfilter Grob 3" (made in Germany), whose porosity is 500 mμ.

2. Determination of Particulate Iron on the Filter

Particulate iron separated on the dried filter was determined colorimetrically by means of α, α'-bipyridyl method which was utilized by Lewis and Goldberg (1954).

The molecular filter was taken out from the sealed emvelope, and placed in 30 ml Kjeldahl flask containing 5 ml of perchloric acid. Heat was applied until no further evolution of acid fumes was observed. When cooled, 1 ml of 1.2N HCl and 10 ml of water was added, after which the contents were transferred to a 50-ml measuring flask. The Kjeldahl flask was rinsed with two 10 ml portions of water. The combined solutions were treated with 1 ml each of 10% hydroxylamine hydrochloride, 50% sodium acetate, and 0.4% bipyridyl solutions. After the sample was diluted to 50 ml, its optical density was determined in an A. K. A. Photoelectric Tube Colorimeter (Kotaki-Seisakusho Ltd.) at 530 mμ with utilization of a S-53 Filter attached to the colorimeter.

In the present experiments, all of the reagents were utilized of Reagent Grade, and various pretreatments were employed for most of them for the purpose of removing any trace impurity of iron, previous to their preparation of reagent solutions:

Solution of recrystallized hydroxylamine hydrochloride was treated with o-phenanthlorine solution and the colored ferroin complex was extracted with redistilled iso-amyl alcohol until no further red color appeared. The same pretreatment was also applied to the solution of sodium acetate. Glacial acetic acid and hydrochloric acid were respectively distilled, but only perchloric acid was utilized without any treatment because of the practical difficulty of its purification. The sixty percent solution of perchloric acid (Wako Junyaku Co.) used in the present experiments contains 0.3 γ/ml of iron as impurity. The distilled water was used after passing further the columns of ion exchange resins for rendering completely free from iron.

If the reagent solutions are properly purified, the only extraneous iron comes from the perchloric acid and the molecular filter. The blank test showed the existence of 1.6 γ iron in average, of which the portion from the filter was 0.4 γ.

Results and Discussion

Data obtained from the present investigation are summarized in Table 1. A typical example of vertical distribution of the particulate iron is plotted in Figure 2 in comparison with the other physical and chemical data (Fac. Fish. Hokkaido Univ. 1956; Kato, 1957)

measured in the present expedition. In these figures, the "turbidity" was determined on board by the scattering intensity method just after collecting the water sample, and is indicated as Coleman Nepheros Unit.

Table 1. Particulate iron in the Bering Sea

Os 7 (53°02′-N, 172°00′-E)		Os 8 (54°30′-N, 170°33′-E)		Os 10 (57°41′-N, 167°59′-E)		Os 13 (58°30′-N, 173°15′-E)		Os 15 (55°10′-N, 173°17′-E)		Os 27 (58°49′-N, 178°43′-W)		Os 37 (52°15′-N, 161°09′-W)	
Depth m	Fe γ/L	Depth m	Fe γ/L	Depth m	Fe γ/L	Depth m	Fe γ/L	Depth m	Fe γ/L	Depth m	Fe γ/L	Depth m	Fe γ/L
0	226	0	20	0	72	0	71	0	32	0	38	0	51
10	67	10	8	10	26	10	13	10	8	8	13	10	11
25	38	25	6	25	34	25	16	24	6	21	7	25	25
50	60	50	6	50	14	50	77	48	8	42	9	50	8
75	82	75	2	75	64	75	7	72	8	60	6	75	2
100	14	98	8	99	100	98	16	92	2	100	12	100	5
150	8	147	15	150	27	148	10	138	20	141	8	150	8
200	19	197	14	200	15	197	17	184	4	169	2	200	13
292	10	295	3	269	8	278	19	276	2	240	13	298	12
392	21	394	15	365	20	370	20	369	5	302	2	398	21
492	3	493	6	460	27	464	11	460	2	361	11	498	14
591	12	593	3	555	26	554	8	554	8	478	6	597	14
785	10	792	8	740	8	754	20	749	7	625	17	796	17
990	40	980	9	935	25	942	22	939	5	799	12	994	20
1184	6	1177	15	1162	14	1170	8	1120	2	1053	12	1193	8
1485	3	1472	3	1456	18	1460	15	1400	8	——	——	1492	18
——	——	1989	11	——	——	——	——	——	——	——	——	——	——

A number of oceanographic observations in the Bering Sea (Barnes & Thompson, 1938; Watanabe et al, 1954; Mishima & Nishizawa, 1955; Koto, 1957) may demonstrate the following hydrographic features of the Bering.

The deep waters below about 200 meters are similar to these in the subarctic region of the North Pacific, on the basis of temperatures, salinities, and dissolved oxygen values at stations within the Bering to the south of the Aleutian Chain. At the intermediate region ranging at depths of about 75 to 200 meters, characteristic layers of cold waters of which the salinities are approximately similar to those of the upper layers were observed at all stations in the Bering. The temperature minimum of the dicothermal layer was found near 150 meters level, and an oxygen minimum appeared usually at the upper level of the dicothermal layer. Accordingly, as pointed out by Barnes and Thompson (1938), the depth of the temperature minimum in the dicothermal layer may represent the depth to which convection currents reach in the winter season.

Lewis and Goldberg (1954) pointed out in respect to the vertical distribution of iron

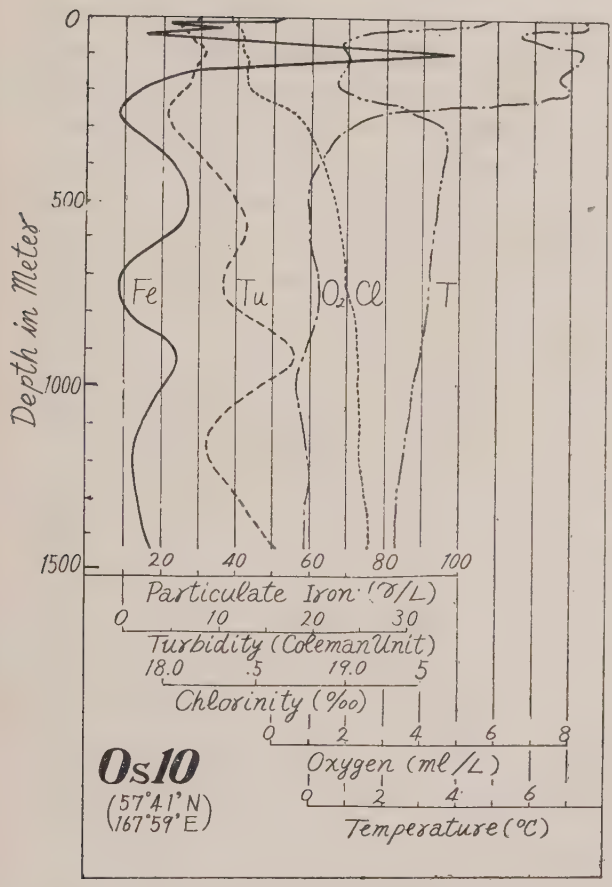


Fig 2. Vertical distribution of particulate iron contents with relation to the other properties of water

in the Bering that the particulate iron in waters deeper than 500 meters averages 4.5 γ/L whereas is shoaler waters the values were ofttimes higher and showed a wide variation with depth. In accodance with the hydrographical features as noted above, it seems not always adequate to discuss the vertical variation of the iron values dividing the column of water into two portions at the depth of 500 meters. Now the present investigation showed that the particulate iron is usually accumulated in rather more advance at depths less than 200 meters and possesses a wide range of scatter whereas in the deeper layer below 200 meters the amount of particulate iron seems rather small and to be changing with depth within comparatively narrow ranges.

Table 2 indicates the average contents and standard deviations corresponing to the particulate iron at the present stations.

Table 2. Average and standard deviation of particulate iron (γ/L)

Station	< 200 m		> 200 m		All Samples	
	Average	Std. dev.	Average	Std. dev.	Average	Std. dev.
7	76.5	68.6	13.8	11.0	41.2	54.0
8	9.1	5.7	8.7	4.7	8.9	5.2
10	48.1	28.8	18.0	6.7	31.1	24.5
13	29.8	28.1	15.6	4.9	21.8	20.2
15	12.1	9.6	4.8	1.9	8.0	7.7
27	11.9	10.5	10.0	4.3	10.9	8.1
37	15.8	15.5	15.2	4.0	15.5	11.0
	28.7		12.2		19.5	

As shown in Table 2, the amount of particulate iron averages 28.8 γ/L in waters

of the upper layers above 200 meters whereas 12.2 γ/L in the deeper water, and the average content is 19.6 γ/L in the waters at all stations. Although the above averages seem to indicate a fairly large content of particulate iron in comparison with data of Lewis and Goldberg (1954), they appear to indicate a relatively small contents than was found in waters off the northwestern coast of the United States (Thompson & Bremner, 1953). In respect to the iron content in sea waters ranging from the surface to the layer deeper than 1000 meters, some of available estimates are summarized in Table 3, inspection of which suggest that the present averages do not always appear excessively abundant in comparison with the others.

Table 3. Iron estimates in oceanic waters

	Location	Depth(m)	Fe in γ/L	
			Soluble	Total
1.	U.S. Coast, Northwest Atlantic	0–3830	5	21
2.	Northeast Pacific	0–2000	8	25
3.	Southern Japan (Open Ocean)	0–1009	—	10
4.	Off SE. Honshu and S. Shikoku (Japan)	0–1554	—	9.5
5.	Suruga-Wan (Japan)	0–1000	—	27
6.	North Pacific, Bering Sea	0–3500	3.5	8
7.	Bering Sea	0–1989	(3.5)	23.5
8.	Bering Sea	200–1989	(3.5)	15.7

1. Rakestraw, N.W., Mahncke, H.E. & Beach, E.F. 1936; Ind. Eng. Chem. (Anal), 8: 136–138.
2. Thompson, T.G. & Bremrer, R.W. 1935; J. Cons. int. Explor. Mer, 10: 38–47.
3. Anonyous, 1951; Res. mar. Obsns., Tokyo, 6: 52–56.
4. Kawamoto, T. 1952; Sea and Sky, 29: 112–116.
5. Anonymous (b) 1939; J. Oceanogr., Kobe, 12: 37–71.
6. Lewis, G.J. & Goldberg, E.D. 1954; J. Mar. Res., 13: 183–196.
7. Kato, K. 1956; in the present paper.
8. Do

It was usually observed at most of stations that the amount of particulate may change in parallel with the turbidity of the water. A greater or less discrepancy of distributions between the iron particles and the turbidity observed seldom in certain levels of waters may be attributed principally to the temporary supplies of larger particles of iron or to the scattering of populations of micro plankton.

Striking accumulation of particulate iron are apt to cover the boundary between two bodies of waters of which the physical and chemical properties differ from each other, for example, at the thermocline intermediate between the warm surface water and the cold dicothermal water. Such accumulation of suspended particles of iron will be influenced by more or less diminution of decending velocities of particles owing to the higher density of the lower water mass, but, of course, some of these accumulations seem sometimes to be attributable to biological activities of microganisms propagating very actively at the border between these waters, judging from the corresponding oxygen

minimum developed at the depth.

At almost all of stations observed in the Bering, a belt of dicothermal layer of cold water thrusts in between the surface and the subarctic waters as described above. A comparatively thin layer of abundant particulate iron is found at the upper border of the dicothermal layer, whilst beneath the lower limit of the dicothermal layer extends a fairly pronounced accumulation of iron over a few hundred meters of depth range (Stations Os 7, 8, 10 and 13). It is of great interest that this characteristic profile of iron distribution is similar to that of the turbidity of the corresponding bodies of waters.

Since the amount of iron in sea water at a given depth will be no doubt influenced, as suggested in Figure 2 by various factors controlling the oceanographic conditions, it is very interesting to consider the distribution of iron in relation to the hydrographic features of the Bering Sea. A certainly close correlationship may be found between the amount of iron and the dissolved oxygen value at a given depth. That is to say, iron maximum is likely to occur at the same depth as oxygen minimum, as illustrated in Figure 3 in which several lines connecting iron maxima coincide respectively with those of corresponding oxygen minima. Such coincidency may demonstrate that particles of oxydizable iron accumulated abundantly as well as respiratory organisms have consumed a good amount of dissolved oxygen at the iron maximum layer. Furthermore these maximum lines of iron illustrated in Figure 3 will also suggest some trend of hydrographic movement of the waters in the Western Bering.

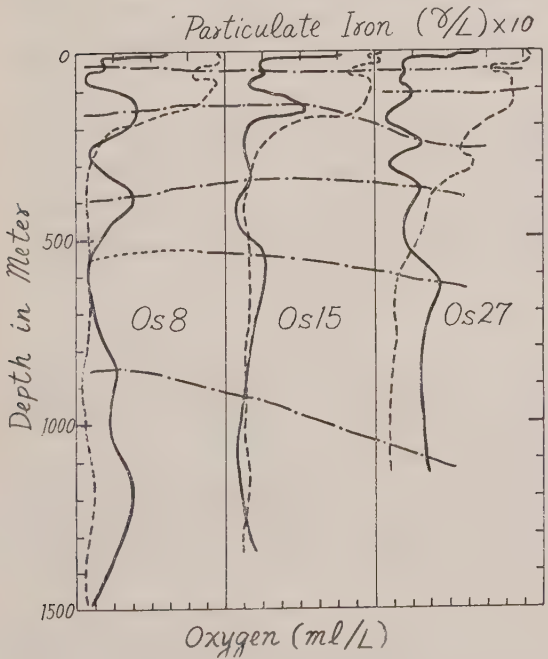


Fig. 3. Correlation of particulate iron content to dissolved oxygen values

Thompson and Bremner (1935) pointed out that a high total iron was observed at the region of minimum layer of dissolved oxygen ranging 800 to 1200 meters, and suggested that the iron maximum layer would be due to the very fine particles which had previously existed in the water when it had approximate contact with the sea bottom. In the present investigation, the maximum layers of the iron somewhat resembling the above feature were found at the levels of similar depth range. But that iron maximum corresponding to oxygen minimum, as illustrated in Figure 3, may be but a case of several maxima usually occurring in the present area, and then it seems not necessarily adequate to judge that

the iron maximum could be attribute to the water which had sometimes contacted with the sea bottom.

An enormous amount of iron was accumulated in the surface water as well as in the intermediate layer near 1000 meter level at Station Os 7, although it is difficult to adduce any causes for these abundant accumulation of particulate iron. An exceedingly concentrated suspension of iron in the surface water would consist of iron particles comparatively poor in number but larger in size, judging from the discrepancy between the iron content and the turbidity (intensity of light scattering) of the water. So, that feature may suggest either some new supply of terrestrial substances from land not to far off the station or biochemical assimilation of iron by strinking propagation of phytoplankton (Motoda, 1956, private communication). While the coincidency of distribution curves of the content and the turbidity in the deeper layer may suggest that a good amount of fine particles of iron would suspend in the intermediate water at about 1000 meters depth.

The author is much indebted to Dr. Shigeru Motoda, leader of the oceanographic expedition in the summer of 1955, Professor of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University, for his untiring encouragement during the investigation. To professor Noboru Suzuki of the Faculty, grateful acknowledgement is due for giving facilities for the work. The author also offers his heart-felt gratitude to Assistant Professor Takeji Fujii, Captain of the Training Ship, "Oshoro-Maru", of the Faculty, for kindly help during the cruise of research.

Furthermore, the author has much pleasure in thanking the gentlemen of the scientific party of the Expedition for assistance in the field work. He is much obliged to Messrs. M. Oguro, N. Yamada and T. Kashiwakura for helping in the laboratory work on board, and to Mr. Y. Ohsono for help in chemical analysis at the laboratory of the University.

Summary

1. Determination was made of particulate iron retained on the molecular filter through which had been passed the water samples collected from seven stations in the Bering Sea during the Oshoro-Maru Expedition in the summer of 1955.

2. In the layer above 200 meters, the particulate iron shows higher values (28.7 γ/L in average) varying within a fairly wide range, whereas in the deeper water lower but less variable values (12.2 γ/L in average) are observed. All of samples obtained from the Bering average 19.6 γ/L.

3. At most stations, the amount of particulate iron varies vertically in parallel with the turbidity (intensity of light scattering) of the water.

4. Remarkable accumulations of particulate iron are apt to extend over the boundary

between two different bodies of waters.

5. It is of great interest that iron maximum is likely to occur at the depth of oxygen minimum. That may be attributed to the consumptions of dissolved oxygen by oxidizable iron particles and/or by biological activities of marine biosphere.

References

Barnes, C. A & Thompson, T. G. (1938). Physical and chemical investigations in the Bering Sea and portions of the North Pacific Ocean. *Univ. Wash. Pub. Oceanogr.* 3 (2), 1–243.

Cooper, L. H. N. (1935). Iron in the sea and marine plankton. *Proc. Roy. Soc. London, B,* 118, 419–438.

——— (1948a). The distribution of iron in waters of the western English Channel. *Jour. Mar. Biol. Assoc., U. K.* 25, 279–313.

——— (1948b). Some chemical contributions on the distribution of iron in the sea. *Ibid.* 27, 314–321.

Faculty of Fisheries, Hokkaido University. (1956). *Hydrogrophic Data Obtained Principally in the Bering Sea by Training Ship "Oshoro-Maru" in the Summer of* 1955. 59p. Hakodate, Hokkaido, Japan; Fac. Fish. Hokkaido Univ.

Goldberg, E. D. (1952a). Iron assimilation by marine diatoms. *Biol. Bull.* 102, 243–258.

——— (1952b). Microfilteration in oceanographic research. I. Marine sampling with the molecular filter. *Jour. Mar. Res.* 11 (2), 194–204.

——— (1954). Marine geochemistry. I. Chemical scavengers of the sea. *Jour. Geol.* 62, 249–265.

Gran, H. H. (1933). Studies on the biology and chemisty of the Gulf of Maine. II. Distribution of the phytoplankton in August, 1932. *Biol. Bull.* 64, 159–181.

Harvey, H. W. (1937a). The supply of iron to diatoms. *Jour. Mar. Biol. Assoc., U. K.* 22, 205–219.

——— (1937b). Note on colloidal ferric hydroxide in sea water. *Ibid.,* 22, 221–225.

Jerlov, N. G. (1953). Particle distribution in the ocean. *Rep. Swed. Deep-Sea Expedi.* 3 (Physics & Chemistry), (3), 73–97.

Koto, H. (1957). Report from the "Oshoro-Maru" on oceanographic and biological investigations in the Bering Sea and Northern North Pacific in the summer of 1955. IV. Hydrography. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 7. (in press).

Lewis, G. J. Jr. & Golderg, E. D. (1954). Iron in marine waters. *Jour. Mar. Res.* 13, 183–197.

Mishima, S. & Nishizawa, S. (1955). Report of hydrographic investigations of the Aleutian Waters and the Southern Bering Sea in the early summer of 1953 and 1954. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 6, 85–119.

Motoda, S. & Fujii, T. (1956). Report from the "Oshoro Maru" on oceanographic and biological investigations in the Bering Sea and Northern North Pacific in the summer of 1955. I. Programme of investigations and records of eye obserbations of sea-birds and marine animals. *Ibid.* 6, 280–297.

Rakestraw, N. W., Mancke, H. E. & Beach, E. F. (1936). Determination of iron in sea water. *Ind. Eng. Chem.* (*Anal.*) 8, 136–138.

Rankama, K. & Sahama, T. G. (1950). *Geochemistry.* 912p. Chicago; Univ. Chicago Press.

Sverdrup, H. U., Johnson, M. W. & Fleming, R. H. (1946). *The Ocean, their physics, chemistry and general biology.* 1087p. New York; Prentice-Hall Inc.

Thompson, T. G. & Bremner, R. W. (1935). The occurrece of iron in the waters of the Northeast Pacific Ocean. *Jour. Conseil Int. Explor. Mer.* 10, 39–47.

Watanabe, N. et al. (compiled by) (1954). *Hydrographic Data in the Northern North Pacific and Adjacent Seas Obtained in 1887 to 1953.* 556p. Tokyo; Nogyogijutsu-Kyokai.

THE FORMATION OF MAGNESIUM-AMMONIUM-PHOSPHATE CRYSTALS IN CANNED SEA FOODS

II. Solubility of struvite formed in canned sea foods and $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ crystals synthesized in laboratory

Eiichi TANIKAWA, Yoshio NAGASAWA and Takashi SUGIYAMA
Faculty of Fisheries, Hokkaido University

The solubility of a solid in solvents is influenced by many factors, *e.g.*, by temperature or the nature of the solvent, etc. If other conditions are kept constant, the solubility of a solid depends on the temperature. As saturated solutions involve respective amounts of the solute in equilibrium to temperature, the solid crystallizes out with the evaporation of the solvent or the lowering of temperature of the solution and this crystallizing continues until the solution reaches equilibrium with the solubility at a given temperature. The pH of the solution also influences the solubility of the solid.

The authors have studied the solubility of struvite formed in canned crab and that of crystals of $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ synthesized in the laboratory, at various temperatures and pH values.

1. Solubility of crystals at various temperatures

(*1*) *Sample*

Two kinds of samples were employed as follows.

(a) Struvite crystals (particles) of about 1.3~5.0 *mm* in size which were found in canned crab.

(b) Synthesized crystals of $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ which were prepared in the authors' laboratory

(*2*) *Experimental method*

An apparatus that is shown in Fig. 1 was employed for the experiment. Each 0.1 *g* of the samples was put into 100 *cc* of redistilled water in a large test tube (160 *cc* volume) which was kept in water in a thermostat within a temperature difference of ± 0.2°C. After stirring the solvent containing crystal for 30 minutes at each of the given temperatures, the authors took 50 *cc* of the filtrate with a pipette as soon as the dissolved solution had been

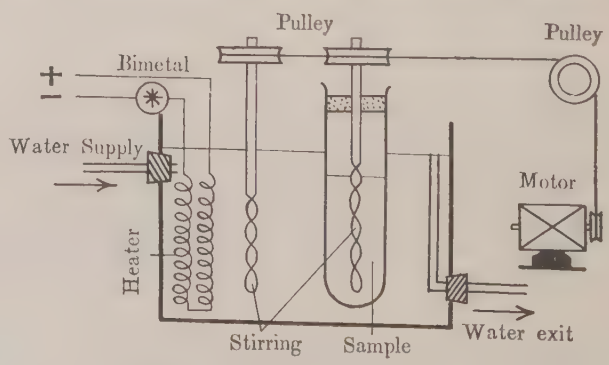


Fig. 1. Apparatus employed for estimating the solubility of the crystals

filtered through a filter paper (Toyo Filter Paper Co. No. 5) in a hot water jacket funnel of the same temperature as the above-described thermostat.

The amount of Mg in the filtrate was measured as follows: Mg in the solution was precipitated as oxine compound by addition of 2 *cc* of 95 % alcoholic solution of 2 % 8-hydroxyquinoline. The precipitate obtained was dissolved with HCl, to which N/10 $KBrO_3$ had been added. The excess quantity of $KBrO_3$ was titrated back with N/10 $Na_2S_2O_3$. The solubility of the crystal was calculated from the measured amount of Mg.

The reason that the stirring time was 30 minutes in this experiment was that there is no difference whether the stirring time is 30, 60, 90 minutes or 24 hours. That is to say, the solubility was known to reach equilibrium by stirring of 30 minutes.

(3) *Experimental results*

The range of the temperature at which solubilities were estimated was from 20° to 85°C. The range of the temperature for the crystal synthesized in the laboratory was from 0° to 100°C.

The variations of the solubilities of both kinds of crystals at various temperatures are shown as Tables 1 and 2. The results in Tables 1 and 2 are shown as Figs. 2 and 3.

As seen in these figures, there was some difference in the solubilities of struvite formed in canned crab and those of the synthesized crystal. The solubility of the former is largest at about 65°C, and decreased with the heightening or lowering of the temperature. The solubility of the latter is the largest at 40°~50°C, and it decreased with the heightening or lowering of the temperature. The difference of the solubilities of both crystals seems to be due to the density or to the size of the crystal. However, the solubilities of the two kinds of crystals are small at various temeratures.

At any rate, the solubility of the crystal is the largest at 40°~65°C, and decreases

Table 1. Solubility of struvite at various temperatures

Measuring temp. (°C)	20	25	30	35	40	50	55	60	65	75	85
The amount of magnesium (‰)	—	0.025	0.030	0.05'	0.072	0.110	0.180	0.210	0.220	0.110	0.072
Solubility of the struvite (‰)	—	0.28	0.33	0.57	0.78	1.20	2.00	2.30	2.40	1.20	0.79

Table 2. Solubility of the synthesized crystal of $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ at various temperatures

Measuring temp. (°C)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
The amount of magnesium (‰)	0.109	0.131	0.182	0.248	0.306	0.306	0.270	0.282	0.210	0.168	0.080
Solubility of crystal synthesized (‰)	1.09	1.32	1.84	2.51	3.09	3.09	2.73	2.85	2.12	1.70	0.81

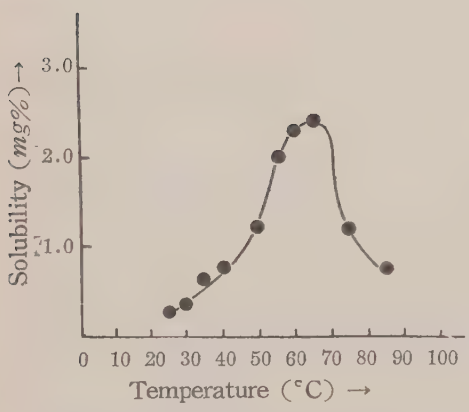


Fig. 2. Solubility of the struvite at various temperatures

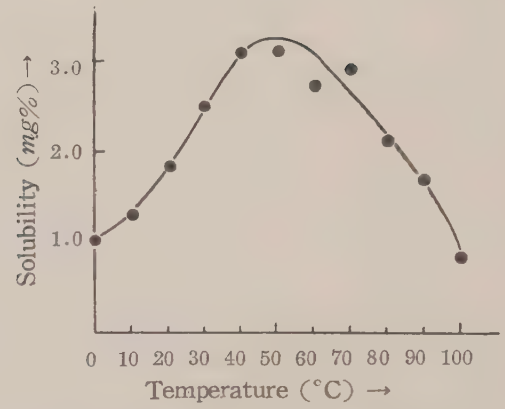


Fig. 3. Solubility of the synthesized crystal of $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ at various temperatures

with the heightening or lowering of temperature. The solubilities of chemical compounds decrease generally with lowering of temperature and increase with heightening of temperature. In this experiment, the solubility decreased with heightening of temperature, so these results were considered to be due to some reason. Accordingly the authors have repeated the experiment two or three times, but the same results were obtained.

2. Variation in the proportion of the insoluble part of the crystal at various temperatures

The authors have ascertained futhermore the variation of the solubilities of synthesized crystal by measuring the amount of magnesium in the insoluble part of the crystal on the filter paper which was treated by the same method as previously described at various temperatures.

The variation in the proportion of the insoluble part of the crystal was manifested by the ratio (%) of the amount of magnesium in insoluble part of the crystal to the total amount of magnesium in the crystal employed.

Table 3. Variation in the proportions of insoluble part of the synthesized crystal at various temperatures

Measuring temp. (°C)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
The amount of total magnesium (mg)	55.9	50.2	62.7	50.2	55.3	42.4	56.9	59.2	62.1	52.5	58.3
The amount of insoluble magnesium (mg)	54.8	48.9	60.9	47.7	52.2	39.3	39.3	56.4	60.1	50.9	57.5
$\frac{\text{Insoluble Mg}}{\text{Total Mg}} \times 100$	98.1	97.5	97.2	95.0	94.4	92.7	94.6	95.2	96.8	97.2	98.7

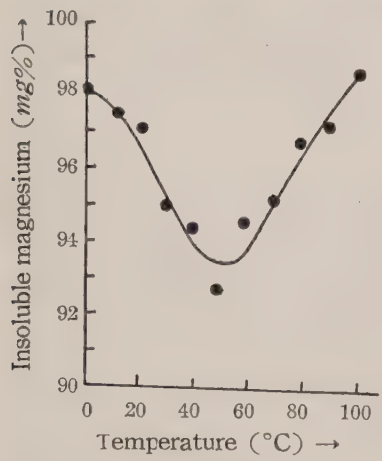


Fig. II-4. Changes in the amounts of insoluble magnesium in various temperatures

As seen in these figures, the crystal became hard to dissolve with heightening or lowering of the temperature as boundary of 50°C. The graph in Fig. 4 is the reciprocal of Fig. 3. So the results obtained in the previous article were not influenced by any experimental error.

In view of the results reported in Articles 1 and 2, the solubility of the crystal is the largest at 40°~65°C, and decreased with heightening or lowering of the temperature, but the solubility of the crystal is small at other temperatures.

The crystallization of the crystal occurs as a result of the change of the temperature. The crystallization increases within the range of the temperature at which the solubility decreases remarkably.

The authors have calculated the difference of the solubility at various ranges of temperatures from Table 2, as shown in Table 4.

Table 4 The difference of the solubility at each range of temperatures

Range of temperatures (°C)	100° ↓ 90°	90° ↓ 80°	80° ↓ 70°	70° ↓ 60°	60° ↓ 50°	50° ↓ 40°	40° ↓ 30°	30° ↓ 20°	20° ↓ 10°	10° ↓ 0°
The difference of the solubility	+0.91	+0.42	+0.73	−0.12 (?)	+0.36	0	−0.18	−0.67	−0.52	−0.23

(Note) In this table + shows increasing of the solbility with the lowering of the temperature, and − shows decreasing.

The difference of the solubility of the crystal which occurs by lowering of temperature from the upper limit temperature in each range of the temperatures, increased until 50°C and decreased below 50°. This is because the maximum solubility is at about 50°C.

As above stated, the solubility decreased above 50°C. That is to say, the crystalization becomes easy. However, the shape of the crystal crystallized out above 50°C was amorphous and it was needle-shape below 50°C. (Ref. the next report). Considering the crystallization below 50°C, the differences of the solubilities between 30°~20°C and 20°~10°C were large being largest at from 30° to 20°C. That is to say, in this latter range the crystallization is the easiest.

3. The difference of the solubilities due to the hydrogen ion concentration of the solvent

Many investigations[1] have shown that the struvite obtained from the canned sea foods

is easily dissolved by acids and then is soluble in gastric juice, so it is harmless for human beings. The authors have observed the variation of the solubilities of struvite formed in canned crab and the synthesized crystal at various pH values.

(1) Experimental method

The pH values of the solution in which crystals were to be dissolved were adjusted by Walpole's buffer solution[2] (acetic acid−acetate solution: pH 3.0∼5.6) and Palitzsch's buffer solution[3] (boric acid−borate solution: pH 6.7∼9.0). The temperature at which the solubilities at various values of pH were estimated was 30°C. The method of estimation was the same as that described above in Articles 1 and 2.

(2) Experimental results

The experimental results concerned with the influence of pH of solvent upon the solubility of the crystals are shown in Tables 5, 6 and Figs. 5, 6.

Table 5. Solubility of the struvite in solvents of various pH values

pH	3.0	3.2	3.6	3.8	4.0	4.2	4.6	5.0	5.4	6.7	7.0	7.6	8.0	8.5	9.0
The amount of magnesium(‰)	2.4	1.9	1.9	0.59	0.59	0.44	—	0.35	—	0.43	0.39	0.29	0.07	0.04	0.02
Solubility of struvite (‰)	26	20	20	6.5	6.5	4.8	—	3.9	—	4.7	4.2	3.2	0.8	0.5	0.2

Table 6. Solubility of the synthesized crystal of $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ in solvents of various pH values

pH	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	7.0	7.5	8.0
The amount of magnesium (‰)	3.2	3.5	0.49	0.40	0.40	0.24	0.59	—	0.11	0.08
Solubility of crystal synthesized (‰)	35	39	5.3	4.4	4.4	2.4	6.0	—	1.2	0.9

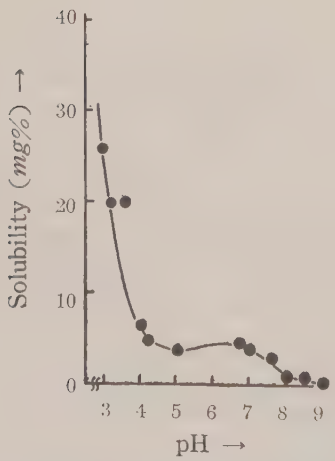


Fig. 5. Solubility of the struvite in solvents of various pH values

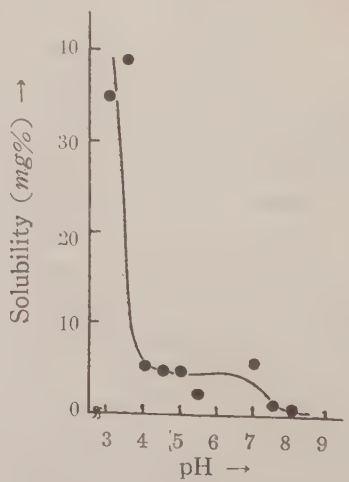


Fig. 6. Solubility of the synthesized crystal of $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ in solvents of various pH values

As seen in Figs. 5 and 6, the solubility varies with the pH of the solvent. The solubility is comparatively larger in acidic side beyond pH 4.0, and smaller in alkali side beyond the same value of pH. That is to say, the solid crystallizes easily in alkali side beyond pH 4.0.

Summary

The solubilities of the struvite formed in canned crab and the synthesized crystal of $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ are the largest at 65°C (struvite) and 50°~40°C (synthesized crystal). The solubility decreased with heightening above or lowering below those temperatures. The crystallization was easy below 50°C and the crystals formed were needle-shape. But the crystals formed above 50°C were amorphous. The easiest crystallization occurs within the range of 30°→20°C owing to the remarkable difference of the solubility. The solubility of the crystal becomes smaller with the increasing of pH value (alkali side beyond pH 4.0).

That is to say, if the juice of the content of canned sea foods is in alkali side beyond pH 4.0, the crystal will be easily formed.

Literature cited

1) Clark, E. D. & Clough, R. W. (1925). *Pac. Fisher.* (23), 11-12.
2) Walpole, G. S. (1914). *Biochem. J.* 105, 2501.
3) Palitzsch, S. (1915). *Biochem. Z.* 70, 333.

ON THE MECHANISM OF THE APPEARANCE OF THE SCALE STRUCTURE

V. The Possible Role of Alkaline Phosphatase in the Formation of the Teleost Scale

Jurô YAMADA
Faculty of Fisheries, Hokkaido University

INTRODUCTION

The teleost scale which is one of the hard tissues developing in the mesodermal connective tissue under the epithelium is distinguishable from the other integumental structures such as spine, teeth, and placoid scale of the selachians etc. of ectodermal origin. This suggests that the process of scale formation corresponds with that of the membrane bone which occurs directly in the connective tissue without passing through the processes of chondrogenesis and secondary ossification after its destruction. A teleost scale consists of two portions, an upper bony layer and a lower fibrous layer. The former increases in area with growth but not in thickness and calcium salts deposit on it, while the latter, the so-called fibrillary plate, consists of several thin fibrous laminae which are not calcified. The histogenesis of two portions of the scale still remains as an undecided problem. The concentric ridges which are the most available structures for age determination are homogeneous with the bony layer and confined to it.

Neave (1936, 1940) suggested in his histological studies of the scale of the trout and the goldfish, that the stages in the laying down of the bony layer are typical of the formation of membrane bone in general. On the other hand, Robison and his collaborators (1923, 1924, 1933, 1934) offered an explanation on the mechanism of ossification from the evidence that the increase of the amount of alkaline phosphatase and glycogen is recognizable in the hypertrophic cartilage cells, that is, alkaline phosphatase is concerned in the process of ossification by effecting on phosphoric esters in the blood, thus bringing about a local increase in the concentration of inorganic phosphate ions, so that the product of the concentrations of phosphate and calcium ions becomes greater than the solubility product of calcium phosphate, which is thereupon deposited in the solid state. Later on, it was supposed that hexosemonophosphoric esters liberated in the process of glycolysis become the substrate for phosphatases. Although the opinion stated by Robison and others yet contains some unsolved problems, it is undoubtedly true that the alkaline phosphatases play an important part in the process of ossification.

During the developmental stages as well as the growth of fish scale, also, it is interesting to ascertain whether or no alkaline phosphatase exists in associated tissues. If that is so, the histochemical tests for tissue sections will offer effective pictures to determine the remaining problem concerning the histogenesis of both the bony and the fibrous layers of the scale.

The writer wishes to express his gratitudes to Prof. S. Saito for his kindness in the revision of the manuscript. Thanks are also due to Assist. Prof. T. Kubo who gave facilities to take the materials in rearing, and to Mr. K. Arai for technical assistance in electrocolorimetry.

This study was performed in a part with funds supplied by a Grant in Aid for Miscellaneous Scientific Reseach from the Ministry of Education.

MATERIAL AND METHOD

For the observation on the developmental process of the scale, 33 young of the rainbow trout, *Salmo irideus* GIBBONS, ranging from 2.1 to 4.2 cm in body-length, were used. They were from half a month to three months old after hatching in the rearing pond of our Faculty. Besides, an about nine-months old fish, 15.5 cm in body-length, reared in the same pond, was used to observe the tissue surrounding the normal growing scale.

Early in winter, when the season causes the growth of fishes to cease, 24 of the goldfish, *Carassius auratus* (*LINNÉ*), were brought from the nursery. They were about half a year old, ranging from 3.5 to 4.5 cm in body-length; they were then reared continuously in the laboratory during the period from December to the following April. The fishes were divided into four groups; each was kept in a cylindrical glass tank containing five litres of water. The water temperature of two of the groups was controlled at 20 to 22°C and the other two at 4 to 7°C during the experimental period. One of the two groups respectively was fed on earthworms and grain foods; the other was kept under the starved condition. Therefore, fishes in rearing experiment consisted of four groups: fed in comparatively warmer water (WF), starved in warmer water (WS), fed in comparatively colder water (CF), and starved in colder water (CS). Previously, from the fishes in each group 15 scales were flayed off from the left body-side in 3 rows, putting the lateral line between them, just below the dorsal fin. Then the regenerated scales in the operated area and normal ontogenetic scales from the just opposite body-side were examined at intervals.

As fixatives, Bouin's and Helly's fluids for the histological preparations, cold 80% alcohol or acetone for the histochemical detection of alkaline phosphatase, and Gendre's modification of Allen-Bouin's fluid for that of glycogen, were respectively employed. The fixed materials were sectioned into 8μ by the paraffin-embedding method. In the histochemical test for alkaline phosphatase, Gomori's calcium-cobalt method, soduim-β-glycerophosphate buffered pH at 9.0 as the substrate, was employed. For the demonstration of glycogen, Bauer's cromic acid Schiff reaction and Best's ammonia carmine reagent were used on the collodionized tissue sections of developing scale. The usual histological stainings such as Ehrlich's or Delafield's haematoxylin, Mallory's triple connective tissue stain, and Heidenhain's Azan stain were also employed.

Apart from the histochemical observation, the measurement of hydrolytic power of alkaline phosphatase in the kidneys of the fishes being under experimental conditions was once performed *in vitro* to find out about any possible relationship between the enzymic activities of the kidney and the connective tissue.

OBSERVATIONS

I. Developmental process of the scale in the rainbow trout

The skin is composed simply of two layers, a stratified epithelium having many scattered mucous cells and a subjacent comparatively thinner connective tissue layer of corium, until the scales begin to develop. Beneath the connective tissue is a pigment cell layer which divides the skin from the muscular tissue. No alkaline phosphatase is demonstrated in this stage.

When the fish grows to about 3 cm in body-length, the corium seems to differentiate into two layers: the spindle-shaped fibroblasts are seen sporadically in the upper loose fibrous layer, while the under layer consists of conspicuously compact fibrous bundles amongst which the cellular elements are rarely encountered. The fibres of the upper loose layer mostly take the blue color of anilinblue dye but the under compact fibres are stained red by the application of Heidenhain's Azan.

The fibroblasts in the loose connective tissue layer, now, begin to aggregate at regular intervals to form the "cutis papillae" or the "scale papillae"; at this stage the enzyme is first detected in the fibroblasts as black stained cells (Fig. 1). The cells transformed into the papilla are larger in size and more rounded in shape than the original fibroblasts, showing an intense activity of phosphatase. The network of blue-stained fine fibrils connecting the osteoblasts with each other can be seen in the section to which Mallory's triple stain was applied.

The cells of the scale papilla arrange themselves into two layers, and a thin origin of scale appears among them (Fig. 2). This is the origin of the upper bony layer and is similar to osteoid or preosseous tissue of the bone. It is observed, as the growth of scale advances, that the osteoblasts in scale papilla receive reinforcement of cells from the surrounding connective tissue, not from the underlying general corium, because no fibroblast possessing phosphatase activity is seen in the latter (Fig. 3). The osteoblasts adhering closely to their own products get lean and are flattened gradually; they begin to degenerate from the central region of the scale. The degeneration takes place sooner on the upper side, so the cells of the lower side remain until comparatively later (Figs. 4 and 5). The naked region resulting from the disappearance of the contacted cells calcifies simultaneously, stained in black also by Gomori's technique (for the technique shows the enzymic site as a deposition of calcium phosphate). From this fact, it is understood, as in the case of the calcification of bone, that the osteoblasts bring forth the matrix of bony layer first, and the secondary deposition of calcium

salts is effected on it by their phosphatase activities.

The remaining cells of the lower side also disappear finally, so the lower surface of the scale becomes in direct contact with the wall of connective tissue, and only around the periphery do the active osteoblasts always surround the growing scale. Thus the scale is enclosed by fibrous connective tissue named the "scale pocket". It is necessary to consider the functional difference between the upper and lower cells of the scale, although the cells of both sides are originally the same. Before the lower cells degenerate, above them uncalcifying lower layer of scale appears beneath the calcified layer. Accordingly, it is obvious that the intimate lamina of the under uncalcifying layer is the product of the remained lower cells. A discussion will be presented below how to interpret the thickening of the fibrillary plate after the disappearance of these cells. At any rate, osteoblasts of lower side remain for a while after the laying down of bony material, and break down embedding themselves in their own products (Fig. 6). The behavior of these cells resembles that of the "osteocyte" which commonly lives on in the bone matrix in general ossification.

Circulus as a linear ridge of upper bony layer is formed at the peripheral region and also calcifies (Fig.4). In tissue section, it occurs among two or three osteoblasts so as just to fill their intercellular space with bony material; the tip of the circulus is always towards the scale focus. Inner osteblast is slightly larger than outer one, but the difference in activity of alkaline phosphatase is not indicated.

The scale enlarges according to the growth of the fish; the upper bony layer grows in area by the action of marginal osteoblasts while the lower fibrillary plate increasingly thickens by the addition of lamina from the under wall of the scale pocket (Fig. 7). In the skin of nine-months-old fish, 15.5 cm in body-length, the posterior region of scale in imbricated arrangement penetrates into the epithelium, and alkaline phosphatase is demonstrated in marginal osteoblasts and fibroblasts in the connective tissue wall around the scale, being especially prominent in the former (Fig. 8). There can be seen a thin fibrous lamina on the under wall of scale pocket which is in contact with the fibrillary plate. This is considered as the most freshly formed fibrous lamina of connecitve tissue which may be taken into fibrillary plate by and by. The lamina has no cellular element and just beneath is a row of small nuclei of connective tissue cells, stained also in black, which may have fibrogenic properties.

On the histochemical tests for glycogen, polysaccharides in general, both the methods presented negative results except in the mucous cells in epithelium.

II. Scale regeneration in the goldfish

When a scale is removed from the body surface, an accompanying portion of epithelium and connective tissue is also broken off. The scales were regenerated in a few days in the warmer groups, while in the colder ones they did not appear even four

months later in spite of the rapid recovering of epithelium as in the warmer groups. The result seems to be not influenced by feeding or starving.

Because of the smallness of the tanks neither the growth of the body nor that of the scale was observed in each group during experimental period. The alkaline phosphatase was not represented in the osteoblasts or the fibroblasts surrounding the ontogenetic scale contrary to the active enzyme in the epithelial cells so differing in those of rainbow trout.

Twenty-six days after operation, in a fish of the colder water starved group (CS-26), the operated area is covered with regenerated epithelial cells under which the lost connective tissue is repaired already; the enzyme is detectable only in the epithelial cells which are unresponsible for the scale formation (Figs. 9 and 10). Similarly, in CF-78 and CS-78, the scale pocket is filled with multiplied fibroblasts, but in them no alkaline phosphatase is proved (Fig. 11). As it was thought that the alkaline phosphatase should be synthesized in the epithelial cells regenerated freshly, then, the unoperated skin of just opposite body-side was examined in the same way. The tests for the normal epithelium resulted the same as for the regenerated; the operated and unoperated regions of the skin of WF-50, WS-50, WS-83, WF-85, and WS-90 respectively offered the same pictures, the osteoblasts and fibroblasts around normal ontogenetic and regenerated scale are not stained despite the intense black of upper epithelial cells (Figs. 12 and 13). These facts seem to show that the deficiency of phosphatase under these conditions probably restrained the growth of the scale.

Eighty-six days after operation, the water temperature of CF-tank was raised to 20°C gradually, then, the fish regenerated the scales in 12 days. Both the fibroblasts in connective tissue and osteoblasts adhering to newly formed scale gave clearly positive reaction for phosphatase (Figs. 14 and 15).

The regenerating process does not indicate any essential difference with the developmental process, but it takes place in almost the whole region where scales were previously situated. Osteoblasts dispose themselves in two layers and between them the upper bony layer is formed —— likewise is the process in the rainbow trout —— and also the lower cells remaining in a layer after the disappearance of the upper one are buried away finally in their own products (Fig. 14).

On the regenerated scale, the cellular elements are often seen to be rather more numerous than on the ontogenetic one because of its rapid growing (Fig. 16). Inner attached cells are clearly visible along each ridge especially of the inner region of the scale, while the wide-spread cell-masses of osteoblasts can be seen near the marginal ends of the ridges; between them there are the degenerating osteoblasts under transformation to the inner attached remaining cells. As the capillaries running above and below the scale are destroyed by the scale removal operation, blood corpuscles are often seen

in company with the scale. It would seem that the irregularity of their appearance may have introduced the confusion in the interpretation concerning the cellular contributions to the scale, regarding them as the cells which associate with the scale formation.

Generally, a kidney is known to be abundant in alkaline phosphatase in addition to the osseous tissue. As the appearance of regenerated scale was assumed to be influenced by water temperature, it was questioned whether any correlation exists with phosphatase activity of kidney and connective tissue under various conditions. Accordingly, an attempt was made *in vitro* to measure the enzymic activity of kidney obtained from the fish of 50 days after operation in each group. Water-extracted enzyme was added in the substrate containing known amount of phosphoric ester and after incubation of 18 hours at 36°C, liberated inorganic phosphate was measured by means of photoelectrocolorimeter. The result is given in Table 1.

Table 1. Alkaline phosphatase activity of the kidneys of the goldfishes reared for 50 days under various conditions. Eighteen hours incubation at 36°C in the substrate containing sodium-β-glycerophosphate in veronal buffer adjusted pH at 9.0. Colorimetric measurement was performed by Youngburg & Youngburg's method.

Experimental condition	Fish		Org.-P in substrate (mg)	Inorg.-P liberated per 10mg of kidney, less than control (mg)	Org.-P hydrolysed (%)
	Body-length (cm)	Body-weight (g)			
WF	4.45	2.50	0.054	0.036	66.1
WS	4.00	1.65	〃	0.032	58.8
CF	4.00	2.80	〃	0.019	34.9
CS	4.50	3.60	〃	0.005	9.2

Perhaps owing to the active metabolism of the fishes in warmer groups, their fatness is conspicuously lower than that of those in the colder one. The enzymic activity of the kidney is larger in the order of WF, WS, CF, and CS. The difficulty of sacle regeneration in the fish at lower temperature is supposed to be caused by the intracellular synthetic weakness of alkaline phosphatase due to the inactivation of internal metabolism.

DISCUSSION

The alkaline phosphatase is synthesized in associated cells whenever a scale origin is established or a scale is regenerated, but it is not demonstrated at the time when scale growth is retained. This confirms the idea that the enzyme is indispensable for the laying down or growing of a scale as in the case of bone. The deposition of calcium phosphate as a principal bone salt is a result undoubtedly of the action of alkaline phosphatase, but the manner of production of bone matrix, which may be albuminoid such as ossein, is yet uncertain, though it is well accepted that the enzyme

associates in the formation of intercellular fibrils because of its general occurrence in fibrogenic cells. At any rate, bone matrix is formed primarily by the osteoblasts containing active alkaline phosphatase and calcium salts deposit secondarily on the matrix.

The substrate for alkaline phosphatase *in vivo* is said to be probably hexose-monophosphoric esters formed in phosphorolysis of glycogen (Harris, 1932). Jackson (1955) reported the existence of polysaccharide and protein components in the cytoplasmic granules of the fibrogenic cells of the fowl embryo and suggested that the substances may have fibrogenic properties and may synthesize the collagen fibrils. In the present study, polysaccharides were not proved in osteoblasts of rainbow trout at the scale developing stage. That would seem to be due to the fact that substance is actually absent or that there is only a little present in this case, or that there was some deficiency in the technique of examination. However, in the section on which Mallory's triple stain was employed, blue stained network of fine fibrils connecting the osteoblasts of papilla was seen. These fibrils, judging from their affinity with aniline blue dye, may be supposed to be identical with the osteogenic collagenous fibrils which commonly appear as the precursor of bone.

The cells enclosing the just-formed material show equally positive reaction for Gomori's technique (Fig. 2); they begin to degenerate in the upper layer before they do in the lower (Fig. 5). This is more remarkable in the regenerating stage in the goldfish (Fig. 14). As the upper layer of scale calcifies, it stains in black also by Gomori's technique; between the calcified layer and lower remaining osteoblasts an uncalcifying layer can be distinguished. Hitherto, this layer has been considered as the intimate layer of fibrillary plate, so that, concerning the cellular contributions of the bony and the fibrous layers several different opinions have been advanced. One of them is that the fibrillary plate is laid down by the lower layer cells of the papilla while the bony material is the product of upper elements (Ussow, 1897; Paget, 1920). Another opinion is the supposition of the cell migration around the margin of scale from upper to lower (Creaser, 1926), or from lower to upper side of scale (Setna, 1934). It is said that the same cells produce different materials according to the local movement.

These opinions can not explain the fact of the thickening of fibrillary plate all over the surface which is now in contact directly with the under wall of scale pocket after the disappearance of these lower cells. Setna's view is based on the observation that the fibrillary plate precedes the bony layer, but the actual fact is really the opposite.

Furthermore, there is an opinion which seems to be most likely, viz., that the original cells of the papilla contributes merely to the formation of upper bony layer and it grows only at the periphery while the fibrillary plate is formed as succesively larger laminae being added from the under wall of scale pocket after the degeneration of

interposed osteoblasts (Klaatsch, 1890, 1894; Neave, 1936, 1940; Yamada and Saito, 1953). However, the appearance of the uncalcified layer before the degeneration of the interposed osteoblasts is contradictory to this opinion, if this layer is truly the intimate lamina of the fibrillary plate.

The writer considers the reason of this contradiction as existing in the misunderstanding which makes this layer a part of the fibrillary plate. According to his opinion, the intimate layer of the fibrillary plate is probably not the true fibrous lamina but is uncalcifying bone in which the lower cells are buried. As Neave pointed out, the behavior of lower osteoblasts resembles that of the osteocytes which are normally alive in the bone matrix in general osteogenic process. In the scale, they degenerate forming the uncalcifying layer which is indistinguishable from the fibrous laminae being added later from the underlying connective tissue. At the periphery of the scale only the bony material is laid down, neverthless, inner calcified layer is often less thick than the outermost yet uncalcifying bone. This is a further evidence showing that whole bone matrix does not always receive the deposition of calcium salts.

On the under wall of the scale pocket being in contact with the fibrillary plate, newly formed fibrous lamina beneath which a row of small connective tissue cells, which also show enzymic activity, may be seen. In considering the fibrogenic property of these cells, the existence of alkaline phosphatase is acceptable as a matter of course; notwithstanding, the calcium salts do not deposit on the fibrillary plate. This is probably due to the difference in the physiological state of the two sides of the scale.

The occurrence of concentric ridges has much importance in view of the availability of these structures for the determination of the age of the individuals. There have been approximately three different opinions about above subject. Many investigators noticed a row of cells attaching closely to the inner side of each ridge and supposed that the ridge may be secreted by these cells.

Nusbaum (1907) considered that some of the upper cells may have osteolytic property and that they may absorb the bony material to form the ridge. Also, Neave (1936) suggested the possibility of the osteoclastic absorption of these inner cells and described that the ridges appear to be formed as much by a hollowing out behind as by a building up in front, but he changed his opinion in a later paper (1940). Setna (1934) stated that the ridge is formed in the damming up of scale margin by the restrictive action of scale pocket. Neave's later opinion allows the restrictive action of scale growth itself but not of scale pocket. Setna's view should be denied since the ridges are not always parallel with scale margin or they appear in the regenerated scale before the margin reaches to the pocket wall. Suzuki (1952) reported the gradual increase in the number of ridges being formed inwards on the regenerated scale of goldfish. If his observation is correct, Neave's later opinion should have also to be damaged. As

mentioned above, the setcion of scale in process of the ridge formation shows slightly larger cells closely attached to the inner side of it. Their nuclei are also larger than those of other osteoblasts but the reaction for alkaline phosphatase is the same as that of the others. It must be noticed here that the artefact owing to the diffusion of the precipitates during the incubation in the substrate is unavoidable in the treatment by Gomori's procedure. Hence, the cytochemical specificity of the inner attached cells along the ridge is somewhat uncertain whenever the present method is employed.

The osteoclast is usually a multinucleated giant cell which is said to be derived from the fusion of connective tissue cell or macrophage or even from any cell under histiocytic state (Hancox, 1949). The occurrence of osteoclasts from certain osteoblasts under some stimulation is likely to happen. The present writer can not refer to these inner large cells with regard to their osteolytic property, but the possibility of their possession of such property should be further investigated.

Kato (1953) reported the linear precipitates of calcium carbonate on the inner side of the ridge and of calcium phosphate on the outer side. It is not unreasonable to suppose that the cells in question may have other enzyme which liberate carbonate ions.

The epithelium of the goldfish shows invariable activity of alkaline phosphatase contrary to that of the rainbow trout, so it is supposed that physiological difference of the epithlial cells exists between the two species.

The circumstances, which make the internal metabolism of fish inactive, introduce the idea of the decrease of the alkaline phosphatase activity of the kidney, and probably also of connective tissue. The active metabolism accompanied with sufficient nutrition may bring forth the growth of the scale as well as the body, but in the case with insufficient nutrition it may result in the absorption of scale. However, the regeneration of the scale is controlled chiefly by the former condition and seems to have almost no connection with the latter.

SUMMARY

Histochemical tests for alkaline phosphatase and glycogen were employed on the paraffin sections of the skin of the rainbow trout as well as that of the goldfish. The phosphatase activity of the kidney of the goldfish reared under various conditions was measured *in vitro*. The results may be summarized as follows:

1) The alkaline phosphatase relating to the scale formation is demonstrated in the associated cells during the course of development in the rainbow trout and of regeneration in the goldfish.

2) The osteoblasts around normal growing scale and the fibroblasts in the wall of scale pocket both have the active enzyme, while it is not detectable when the growth of scale is retained.

3) The epithelial cells of the goldfish in any conditions show invariable phosphatase activity contrary to those of rainbow trout.

4) Glycogen, common in cartilaginous ossification, could not be demonstrated in the developing stage of the scale of the rainbow trout.

5) In the goldfish reared constantly at about 20°C, the regenerated scale appeared in a few days, on the other hand, it was not regenerated even in four months in the fish reared at about 5°C. When the water temperature was raised, the scale appeared in 12 days. The appearance of regenerated scale seems to be not affected by the nutrition.

6) General course of the development and regeneration of the scale was described. As in the case of bone formation, the fibroblasts, the osteoblasts, and possibly the osteocytes play a part in the formation of the scale.

7) On the appearance of the ridge, further investigation with regard to the possibility of osteoclastic absorption or other enzymic activity of inner attached cells should be made.

8) The calcium salts deposit on the bony layer of scale, but not in the deeper layer of it, which is so indistinguishable from the fibrillary plate that the name the "lower layer of scale" is not always synonymous with the "fibrillary plate".

9) The comparative values of the activity of alkaline phosphatase in the kidney were measured *in vitro*. The value varies according to the enviromental conditions in which fishes are living.

LITERATURE CITED

Fell, H. B. & Robison, R. (1933). Glycogen and cartilage. *Nature* **131** (3298), 62.

———— & ———— (1934). The development of the calcifying mechanism in avian cartilage and osteoid tissue. *Biochem. Jour.* **28** (6), 2243–2252.

Hancox, N. M. (1949). The osteoclast. *Biol. Rev.* **24** (4), 448–471.

Harris, H. A. (1932). Glycogen in cartilage. *Nature* **130** (3296), 996–997.

Jackson, S. F. (1955). Cytoplasmic granules in fibrogenic cells. *Nature* **175** (4444), 39–40.

Kato, K. (1953). Calcium oxalate and other calcium salts in fish scale. *Sci. Rep., Saitama Univ.*, Ser. B. **1** (2), 51–58.

Klaatsch, H. (1890). Zur Morphologie der Fischschuppen und zur Geschichite der Hartsubstanzgewebe. *Morph. Jahr.* **16**, 209–258.

(1894). Über die Herkunft der Scleroblasten. Ein Beitrag zur Lehre von der Osteogenese. *Ibid.* **21**, 153–240.

Lison, L. (1953). *Histochimie et cytochimie animales, principes et méthodes.* 2e Édit., 607p. Paris; Gauthier-Villars.

Martland, M. & Robison, R. (1924). The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. V. The enzyme in the early stages of bone development. *Biochem. Jour.* **18** (6), 1354–1357.

Maximov, A. A. & Bloom, W. (1952). *A textbook of histology.* 7th Edit., 616p. Philadelphia and London; W. S. Saunders Co.

Neave, F. (1936). The development of scales of Salmo. *Trans. Roy. Soc. Can.*, Sect. V. **30** (3), 55–72.

(1940). On the histology and regeneration of the teleost scale. *Quart. Jour. Micr. Sci.* **81**

(4), 541–568.

Nusbaum, J. (1907). Materialien zur vergleichenden Histologie der Hautdecke der Wirbeltiere. III. Zur Histogenese der Lederhaut und der Cycloid-Schuppen der Knochenfische. *Anat. Anzeig.* **30**, 297–310.

Pearse, E. (1953). *Histochemistry theoretical and applied.* 530p. London; J. & A. Churchill Ltd.

Robison, R. (1923). The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem. Jour.* **17** (2), 286–293.

———— & Soames, K. M. (1924). The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. II. The phosphoric esterase of ossifying cartilage. *Biochem. Jour.* **18** (3,4), 740–754.

Saito, S. (1955). On the mechanism of the appearance of the scale structure. III. On the regeneration of the scales of the Crucian carp, Carassius carassius (L.), when they are reared with the different food. ***Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.*** **5** (4), 332–335.

Suzuki, R. (1952). The changes in structure of regenerated scales of goldfish. *Jap. Jour. Ichth.* **2** (4, 5), 192–195. (in Japanese).

Yamada, J. & Saito, S. (1952). On the appearing mechanism of the scale structure. I. The early development of the scale in the rainbow trout, *Salmo irideus* GIBBONS. *Mem. Fac. Agr., Hokkaido Univ.* **1** (3), 354–360. (in Japanese).

PLATE I

Explanation of Figures

Fig. 1. A section of the skin of the rainbow trout, 3.3 cm in body-length. Black stained fibroblasts aggregate to form the scale papilla under the epithelium. The black layer of pigment cells is not due to the phosphatase reaction. Gomori's Ca-Co method. × ca. 360. e: epithelium, gc: general corium, f: fibroblasts, m: muscle tissue, p: pigment cell layer, sp: scale papilla

Fig. 2. A section of the skin of the rainbow trout, 3.3 cm in body-length. The thin scale origin appears among the rounded osteoblasts of scale papilla. Gomori's Ca-Co method. × ca. 1200. e: epithelium, gc: general corium, os: osteoblasts, so: scale origin

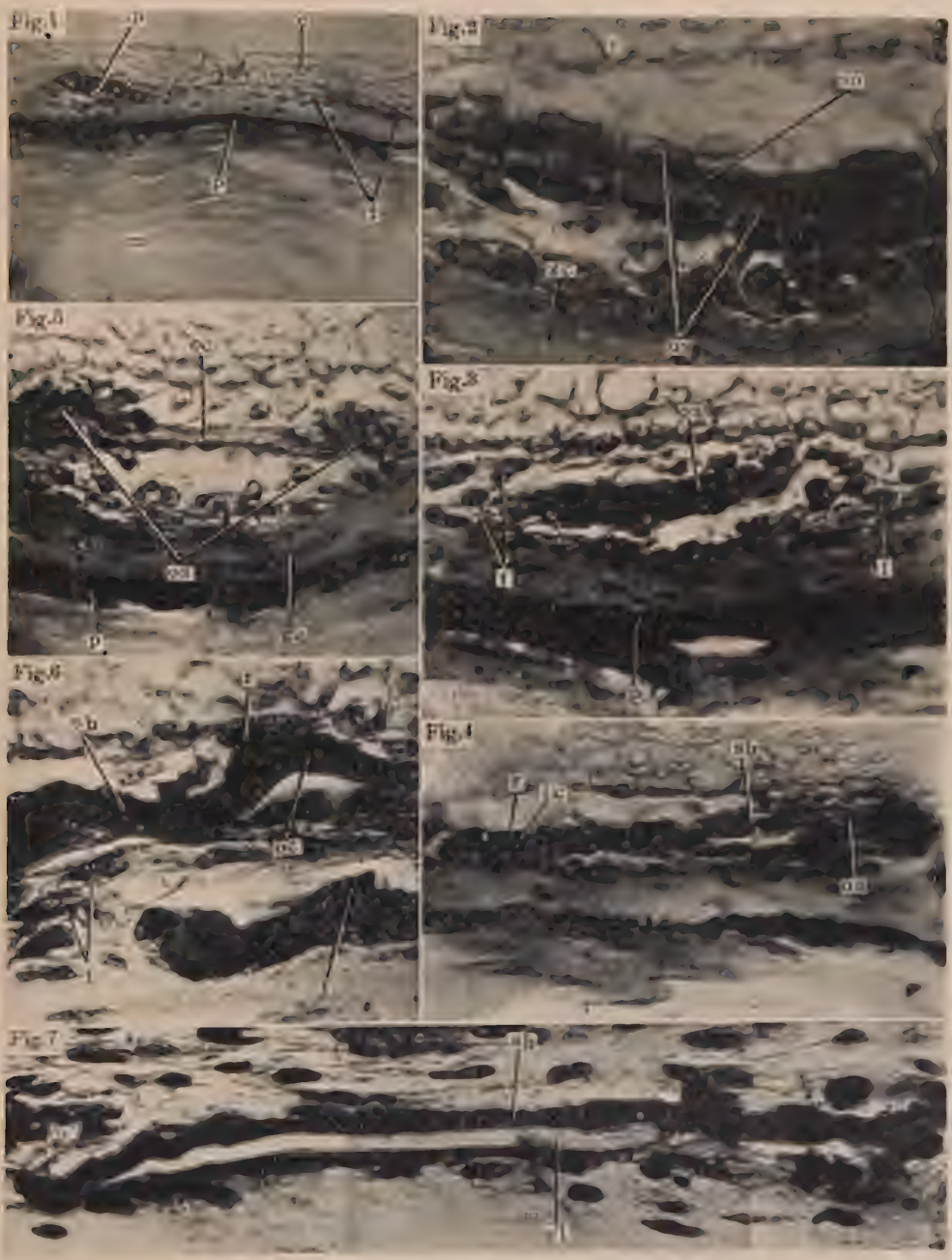
Fig. 3. A section of the skin of the rainbow trout, 3.3 cm in body-length. The osteoblasts of scale papilla receive reinforcement of marginal fibroblasts. Gomori's Ca-Co method. × ca. 1200. f: fibroblasts of surrounding connective tissue, so: scale origin

Fig. 4. A section of the skin of the rainbow trout, 3.3 cm in body-length. The scale grows horizontally and the ridge appears in the peripheral region. Gomori's Ca-Co method. × ca. 1000. ic: inner attached cell of ridge, os: osteoblast, r: ridge, sb: bony layer of scale

Fig. 5. A section of the skin of the rainbow trout, 3.3 cm in body-length. The osteoblasts begin to degenerate from the central region of scale. Some of them remain in close adherence on the lower surface of the scale. Gomori's Ca-Co method. × ca. 1200. gc: general corium, oc: osteocyte, os: osteoblasts, p: pigment cell layer

Fig. 6. A section of the skin of the rainbow trout, 3.5 cm in body-length. The posterior and anterior portions of two scales in imbricated arrangement. Calcified layer stains also in black. Gomori's Ca-Co method. × ca. 2000. f: fibroblasts, oc: osteocyte, r: ridge, sb: calcified bony layer

Fig. 7. A section of the skin of the rainbow trout, 4.1 cm in body-length. The fibrous laminae are added from the under wall of connective tissue, so that, the scale comes to consist of calcified and uncalcified layers. The uncalcified layer is not always identical with the fibrillary plate. Gomori's Ca-Co method. × ca. 1700. sb: calcified bony layer, sl: uncalcifying bony or fibrous layer



J. YAMADA: Alkaline Phosphatase in the Formation of Teleost Scale

PLATE II

Explanation of Figures

Fig. 8. A section of the skin of the rainbow trout, 15.5 cm in body-length. The posterior portion of the scale penetrates in the epithelium; alkaline phosphatase is detected in the osteoblasts surrounding directly the growing scale and in fibroblasts in the wall of scale pocket. Gomori's Ca-Co method. × ca. 120

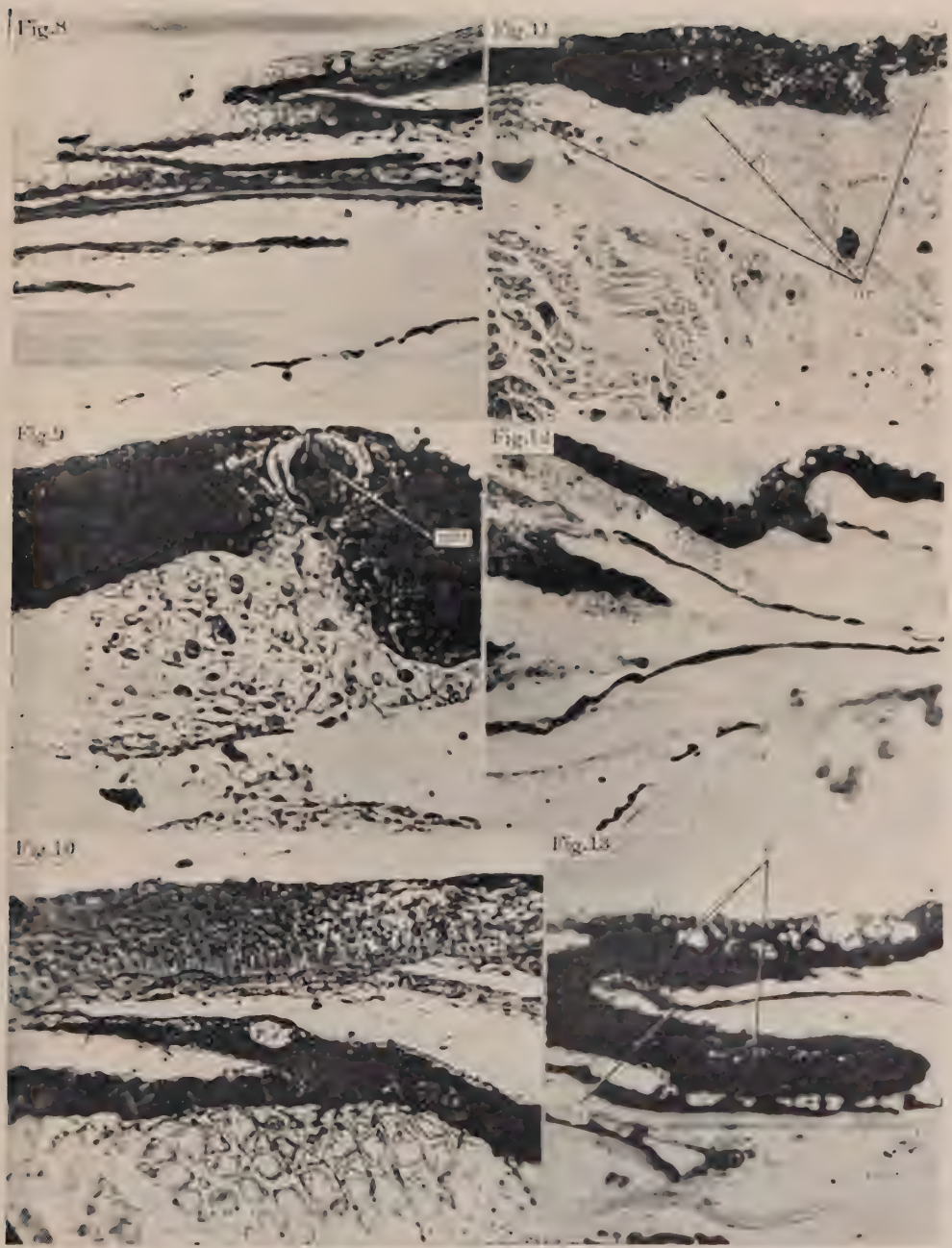
Fig. 9. A section of the operated skin of the goldfish (CS-26). Showing the regenerated epithelium and connective tissue, a neuromast is seen in the former. Alkaline phosphatase is demonstrable only in the epithelium. Gomori's Ca-Co method. × ca. 480. nm: neuromast

Fig. 10. A section of the operated skin of goldfish (CF-50). A similar stage to that in Fig. 9. Delafield's haemetoxylin. × ca. 240

Fig. 11. A section of the operated skin of the goldfish (CF-78). A similar stage to that in Fig. 9. Gomori's Ca-Co method. × ca. 120. or: sites wherein original scales were situated.

Eig. 12. A section of unoperated skin of the goldfish (CF-78). The ontogenetic scales in growth-retaining and associated tissues. Positive reaction for alkaline phosphatase takes place only in the epithelium the same as in regenerated skin. Gomori's Ca-Co method. × ca. 100

Fig. 13. A section of the unoperated skin of the goldfish (WS-83). A similar stage to that in Fig. 12. The epithelium showing positive alkaline phosphatase activity encloses the posterior portion of the scale, but it has no bearing on the growing of scale. Gomori's Ca-Co method. × ca. 200. e: epithelium, s: scale



J. YAMADA : Alkaline Phosphatase in the Formation of Telecst Scale

PLATE III

Explanation of Figures

Fig. 14. A section of the operated skin of the goldfish (12 days rearing in WF after 86 days rearing in CF). The regenerating scale and associated tissues. Ehrlich's haematoxylin. × ca. 150. oc: osteocyte, s: regenerating scale

Fig. 15. A same section as in Fig. 14. Alkaline phosphatase is demonstrated in osteoblasts, fibroblasts, and also in epithelium. Gomori's Ca-Co method. × ca. 150

Fig. 16. A flat mount of the regenerated scale taken from the goldfish (WS-30). Transformation of the osteoblasts to the inner attached cells along the ridge and scattered erythrocytes are visible. Mallory's triple stain. × ca. 400. er: erythrocytes, ic: inner attached cells of ridge, os: osteoblasts

Fig.14

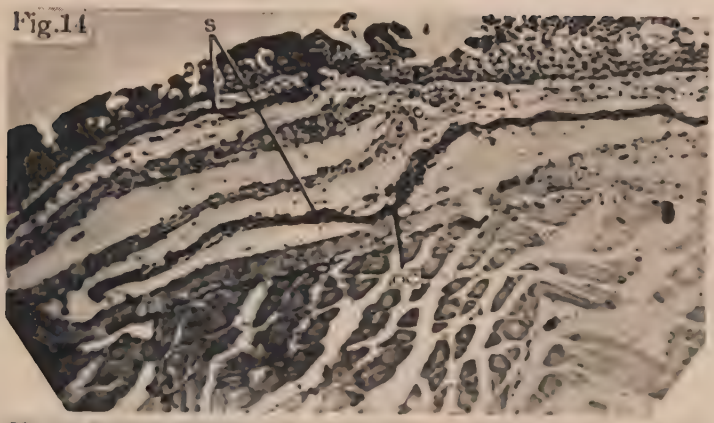


Fig.15

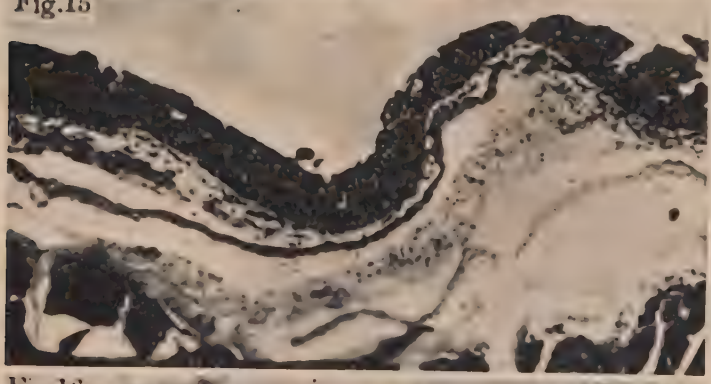


Fig.16

J. YAMADA: Alkaline Phosphatase in the Formation of Telost Scale

ON THE MECHANISM OF THE APPEARANCE OF THE SCALE STRUCTURE

VI. Some Observations Associating with the Absorption of Scale in the Goldfish

Jurô YAMADA
Faculty of Fisheries, Hokkaido University

Foreword

In order to take materials for the histochemical study of alkaline phosphatase, goldfishes were reared in the laboratory for four months as reported in the previous paper. During that period, the writer obtained various stages of regenerated and absorbed scales. It was noticed regarding these scales that the calcified portion differs in area individually with a certain regularity. The phenomenon will be dealt with in this paper. Other observations on the formation of radii, which are the radial grooves on the bony layer of the scale, and on the manner of absorption of the scale under mal-condition for the fish will also be described. These phenomena will be discussed on the common basis of being associated with the absorption of scale.

Material and Method

The scales were taken from the goldfishes which were being reared in four groups. At the beginning, certain scales were removed from each fish to obtain the regenerated scale. Group "WF" means the fishes under the condition of feeding in warm (about at 20°C) water; in this manner, each "WS", "CF", and "CS" means the condition of, in turn, starving in warm water, feeding in cold (about at 5°C) water, and starving in cold water. The numerals followed these initials represent the number of days in rearing. For instance, WF-50 means the fish reared at 20°C for 50 days under food supply.

For the detection of the depositing calcium salts of the scale *in toto*, the writer tried with advantage the procedure of the latter half of Gomori's calcium-cobalt method for alkaline phosphatase. A fresh scale was rinsed in 2% solution of cobalt chloride for 5 minutes, then, the deposit of calcium phosphate or carbonate was changed to cobalt phosphate or carbonate. After thorough washing in distilled water, the scale was transferred into the dilute solution of yellow ammonium sulphide, about 2 minutes; thus the site of calcium salts was demonstrated as black precipitate of cobalt sulphide.

Results and Consideration

The normal growing scale treated with cobalt sulphide method shows a deposit of calcium salts covering almost the whole surface excepting the outermost margin. The uncalcifying margin in which one or two circuli are usually counted is somewhat narrower in the anterior area than in the posterior. Just within the edge of the uncalcifying margin, an intensely stained band borders the central calcified area, and along either side of each

radius is an area stained also in dark black, though the radius itself is never stained (Fig. 1). This is supposed to be an evidence that the just calcified margin as well as the area along the radii has a larger deposit of calcium salts than other calcified area.

Fig. 1. Typical ontogenetic scale removed at the outset of rearing. Treated with cobalt sulphide method. Marginal and radial areas are intensely stained. × 30

In WF and WS, the regenerated scale appears in a few days. It attains almost an equal size and a similar shape with the removed ontogenetic scale within about two weeks. The feature of the regenerated scale of goldfish is characterized by a large central space showing abnormal grooved network and a marginal area in which a few concentric ridges are arranged in considerably wide intervals. The regenerated scales in WF and WS show no difference in scale structure at early stages.

The calcified central areas of these scales are stained uniformly in dark black, and the

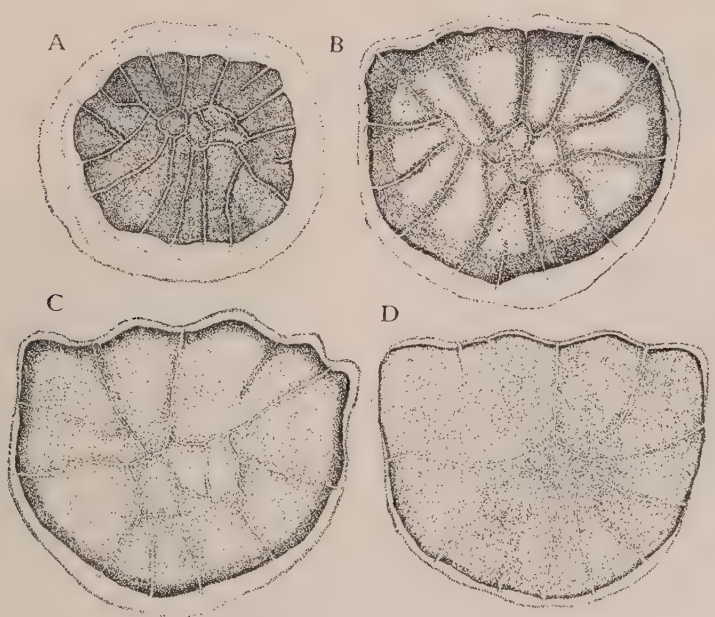


Fig. 2. Semi-diagrammatic drawings showing the order of decalcification in four stages of regenerated scale. Scales were obtained respectively from: A. WF-26; B. WF-50; C. WF-78; and D. WS-50

stainless marginal areas are relatively wider than those of ontogenetic ones, while that of the scale taken from WF–50 shows pale stained portions among the radii. Finally, it comes to take a similar appearance to the ontogenetic one with respect to the calcified area, showing a dark marginal border and narrow regions along each radius. The process is shown in Fig. 2. It is faster in WS than in WF. In WS–50, most scales of both the ontogenetic and regenerated type come to be absorbed at the "shoulder". The intensely stained marginal and radial areas are reduced in the absorbed scale, and at last the areas take on the same appearance as the other pale stained area. In the fishes of CF and CS, in them no regenerated scale appeared, the ontogenetic scales are absorbed with difficulty and their mode in staining shows the preservation of calcium salts in marginal and radial areas as compared to those of WF and WS.

In interpreting the above facts, it is obvious that a part of once deposited calcium salts dissolves out from the bony layer of the scale under even normal condition, and the dissolution is accelerated in warm circumstances probably because of the active metabolism of the fish. If the absorption of scale is caused by the deficiency of calcium salts, it may take place after the dissolution of the soluble salts over the whole surface under the condition of some physiological change. That the area along the radius usually retains much deposit of the calcium salts is probably due to the difficulty of dissolution of the salts in this area for some reasons. However, it is questioned here, whether the staining of radial or marginal area is due to the artefact in the treatment of cobalt solution since the area corresponds to the absent portion of bony or fibrous layer. As control, the scale with bony layer being hurt in linear groove with a fine needle or the scale with a portion of it cut off was treated in the same manner. The vicinity of the artificial groove or of the incision showed no peculiarity in staining.

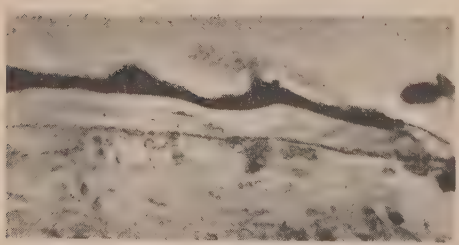


Fig. 3. Section of the absorbed scale margin. Treated with cobalt sulphide method. Uncalcified fibrillary plate is extended beyond the black stained bony layer. × 480

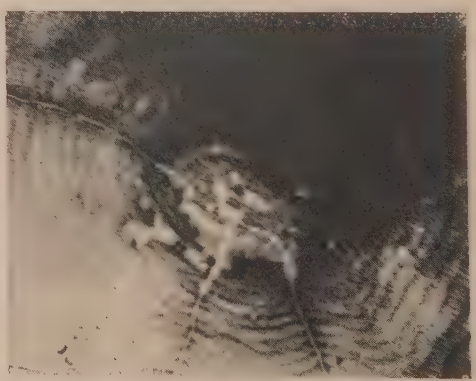


Fig. 4. A portion of the ontogenetic scale showing the absorption of the focal bony layer and exposed fibrillary plate. × 60

The scale grows at the periphery in the laying down of bony material and the fibrillary plate is formed behind this outermost margin. But in the absorbed scale, the corresponding section of absorbed edge represents the inverse relation (Fig. 3). Moreover, a crack being parallel with the absorbed margin was often observed in the flat mount of the ontogenetic scale. These observations indicate that the absorption of the scale occurs at first on the bony layer and consequently the unsupported fibrillary plate, which is left behind freely, is destroyed by mechanical rubbing action. The absorption of the bony material takes place also on the central focal area (Fig. 4).

Then, it is evident that the absorption of scale, which originally means the partial destruction of scale, involves three processes in a broad sense, that is, the dissolution of calcium salts, the erosion of bone matrix, and the mechanical destruction of fibrillary plate. The dissolution of calcium salts may be caused by the local humoral factor, because the alkaline phosphatase, which is responsible for the deposition of solid calcium phosphate, works at high pH level such as 9.0 or above, and at that level calcium phosphate is easily deposited. However, the raising of pH level *in vivo* at the site where the laying down of bony material is taking place may be probable, but usually, the humoral pH does not indicate such higher level. Accordingly, a part of the precipitate should be dissolved again as soon as the lowering of the pH level occurs. Concerning the erosion of bone matrix, the osteoclastic absorption should be kept in mind; this will be discussed below together the consideration of the manner of formation of radius.

The general ontogenetic scale of the goldfish shows a few radii cutting the intersecting circuli. This is a matter of course, for the circuli are the concentric linear elevations of bony layer while the radii are the radial grooves lacking the bony material. But it was frequently observed in the regenerated scale that certain circulus is not cut by the radius but continues across it (Fig. 5). The radius, excepting the absorbed portion, never reaches to the outermost margin, fading out in the uncalcifying bony substance. Therefore, it is quite likely that the radius elongates in the absorption of once formed bony substance. The regenerated scale grows so rapidly until it becomes restricted by the wall of scale pocket, that the above phenomenon might be caused by the elongation of radius unproportionate to the accelerated laying down of bony material. As shown in Fig. 5, a part of peripheral osteoblasts enter into the groove, and if

Fig. 5. Phase-contrast photomicrograph of a portion of the regenerated scale. Outermost circulus continues across the radius. Mallory's triple stain. × 160

these cells are associated with the elongation of radius, they should certainly have an osteolytic property.

It is understood that the elongation of radius as well as the absorption of scale are based on a similar phenomenon, that is, the erosion of bone matrix. Osteoclasts are found in general bone tissue especially where the absorption is taking place. The nature of their function or the stimuli which cause the cells to form, still remain as unsolved questions. They are regarded as arising from fusion of relatively immobile connective tissue cells or of mobile cells such as macrophage. The transformation of cells is said to be reversible from one to the other. In the present study, it can be assumed that the cells found in the radius may be the osteoclasts derived from the fusion of peripheral osteoblasts. Such transformation of cells is very suggestive also in the absorption of bony layer of scale.

Ichikawa (1953) reported similar results on the disappearance of calcium salts before the destruction of the scale of the carp under starvation. He observed on the surface of these scales the remarkably thinner calcified layer compared with that of normal scale and considered that the calcium salts were absorbed from the fibrillary plate, and that thereafter mechanical breaking would take place on the softened portion by decalcification. However, the calcium salts deposit by no means on the fibrillary plate without the calcium oxalate crystals demonstrated by Kato (1953), but are confined to bone matrix. The thinning of bony layer is probably due either to the dissolution of calcium salts from the intimate layer of bone or to the actual thinning of bony layer according to the decalcification. At the initial stage of bone destruction, the marginal area under absorption yet retains much deposit of calcium salts (Fig. 2D). This is a counter-evidence to the conception of the mechanical destruction of bone effected against the softened portion.

The writer is greatly indebted to Prof. S. Saitô who has critically reviewed the manuscript.

This work has been carried out partly with funds from a Grant in Aid for Miscellaneous Scientific Research from the Ministry of Education.

Summary

1) The ontogenetic, regenerated, and absorbed scales of goldfish obtained in the rearing experiment were stained by the cobalt sulphide method, and the phenomena associated with the absorption of scale were observed.

2) The absorption of scale can be interpreted in a broad sense as involving three processes, which are the dissolution of depositing calcium salts, the erosion of bone matrix, and the mechanical destruction of fibrillary plate.

3) A part of once-deposited calcium salts dissolves out from the bony layer even

under normal circumstances. This tends to accelerate as a result of active metabolism accompanied with insufficient nutrition. As a cause of the dissolution of calcium salts, the effect of lowering of humoral pH level is considered. Thereafter, the erosion of bony layer begins on the marginal area, especially on the portion of the "shoulder". It takes place also on the focal area.

4) The radius is elongated also by the partial erosion of bony material. The absorption of scale as well as the elongation of radii seems to be caused by the osteolytic property of certain cells derived in the transformation of osteoblasts.

5) The remaining free edge of fibrillary plate may be destroyed by the mechanical rubbing action.

References

Hancox, N. M. (1949). The osteoclast. *Biol. Rev.* 24 (4), 448–471.

Ichikawa, R. (1953). Absorption of fish scale caused by starvation. *Rec. Ocean. Work. Jap.*, N. S. 1 (2), 101–104.

Yamada, J. (1956). On the mechanism of the appearance of the scale structure. V. The possible role of alkaline phosphatase in the formation of the teleost scale. *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.* 7 (3), 185–201.

STUDIES ON THE FORMATION OF FISH EGGS

IX. The Fate of the Yolk Vesicle in the Oocyte of the Flounder, *Liopsetta obscura*, during Vitellogenesis*

Kiichirô YAMAMOTO
Faculty of Fisheries, Hokkaido Univiversity

This study has been carried out in order to clarify the fate of the yolk vesicles in the oocyte of the flounder. on this subject the present author has already reported that the yolk vesicles of herring and smelt oocytes appear to give rise to the cortical alveoli by migrating towards the periphery of the ooplasm (Yamamoto, 1956 d, e). One noteworthy difference between the vesicles of the two kinds of fishes lies in the nature of polysaccharides occurring in the vesicles, that is, the vesicles of herring oocytes contain mucoids alone throughout vitellogenesis, while polysaccharides contained in the smelt vesicles are transformed from mucoids into mucoids associated with the acid mucopolysaccharides in the course of vitellogenesis. Previously, the writer reported on the origin of the yolk vesicle and the chemical nature of cortical alveoli in the present species (Yamamoto, 1956 b, c), but the relation between the two elements remained open at that time. Hence, after having investigated a large number of preparations the problem has been further attacked as described here.

Before proceeding further, the author would like to express his cordial gratitude to Professor Tohru Uchida, Director of the Akkeshi Marine Biological Station, under whose guidance this work has been performed. The writer is also indebted to Dr. Sajiro Makino, Professor of Hokkaido University, for kind advice.

MATERIAL AND METHOD

This study was carried out exclusively with the oocytes of the flounder, *Liopsetta obscrua*. The material was obtained in a similar way as that described in the former paper (Yamamoto, 1956a). For fixation, Bouin-Allen's, formol-alcohol and Regaud's solution were used. Sections, 10 micra in thickness, were made by the usual paraffin method.

The presence of polysaccharides in the oocyte was examined by means of the periodic acid Schiff reaction (P.A.S.) and Bauer's reaction (cf. Glick, 1949; Lison, 1953). For the differentiation of the P.A.S. -positive substances use was made of the saliva test for glycogen (cf. Ichikawa. 1953), the combined staining method for aminopolysaccharides (Monnè and Slautterback, 1950), the metachromatic staining with toluidine blue for sulfated mucopolysaccharides (cf. Glick, 1949) and Highman's method with methylene blue for the determination of the relative acidity of mucoproteins (cf. Ichikawa, 1953).

* Contributions from the Akkeshi Marine Biological Station, No. 86.

For details in the practice of these cytochemical techniques the former papers may be consulted (Yamamoto, 1956 b, d).

OBSERVATIONS

1. The fate of the yolk vesicle during vitellogenesis

As was described in a former paper (Yamamoto, 1956 b), the yolk vesicles of the flounder make their appearance as minute granules distributed in the periphery of the oocyte in the form of a thin layer. They gave a strong P. A. S. reaction (Fig. 1). Immediately after the formation of the vesicles, yolk globules of small size are seen in the vicinity of the vesicles, intermingled with each other. As the yolk globules exhibited a very faint P. A. S. reaction, it was easy, when the material was fixed well, to distinguish the globules from the vesicles. With the growth of oocytes, the yolk vesicles and the yolk globules continue to be formed centripetally until the ooplasm is filled with them (Figs. 2 and 3). During this period, the globules increase rapidly in size, but the vesicles slowly. At the primary yolk stage small vesicles of diverse forms are found located everywhere in the interstices between the enlarged globules (Fig. 4). In the oocytes of the secondary yolk stage, whilst the vesicles are located sparsely in the outer part and densely in the middle part, no yolk vesicles can be seen in the inner part of the ooplasm. They are spherical in form and gave a strong P. A. S. reaction. In well-fixed materials the yolk globules which are much larger than the vesicles always exhibited a faint P.A.S. reaction (Fig. 5). After careful observations on a large number of preparations, the writer thinks that this statement as to the globules is the correct interpretation, although he reported previously that the yolk globules of this stage located in the middle part of the ooplasm gave a strong P. A. S. reaction (Yamamoto, 1956b). Such an extraordinary response of the yolk globules to the polysaccharide test has been considered to be caused by the diffusion of the vesicle contents. Hereafter, the yolk vesicles, as was described in the previous paper (Yamamoto, 1956 b), gradually migrate towards the outer part of the ooplasm and finally are found arranged regularly in the periphery of the cortical cytoplasm, roughly forming a row (Figs. 6, 7 and 9). Consequently, it seems beyond doubt that the cortical alveoli of the flounder may also be derived from the yolk vesicles as in the case of the herring and the smelt.

2. On the chemical nature of polysaccharides occurring in the yolk vesicles

Polysaccharides contained in the yolk vesicles of the flounder remained unaltered in chemical nature throughout vitellogenesis. The polysaccharide substances reacted positively on the P. A. S. test and Bauer's reaction. Saliva was inactive with respect to the P. A. S.-positive substances. Moreover, the contents of the vesicles were not stained metachromatically either with toluidine blue or with methylene blue in acid solutions, regardless of whether or not the preparations were pre-treated with chromic acid. These

results fit in completely with those in the herring. Therefore, it seems most justifiable to form the same conclusion as that arrived at in the herring, i. e., the mucopolysaccharides in the vesicles may be regarded as neutral mucopolysaccharides (mucoids) and the vesicles contain the mucoids alone throughout vitellogenesis.

DISCUSSION

In contrast to herring and smelt oocytes, flounder oocytes have the vesicles much smaller than the globules. Although some confusing figures have resulted on account of this fact, there remains little doubt that the fate of the yolk vesicles of the flounder is quite similar to what happens in the cases of the herring and the smelt. The vesicles of the flounder exhibited always a strong P. A. S. reaction throughout vitellogenesis. On moving towards the periphery, they appear to give rise to the cortical alveoli which play an important role at fertilization. On the other hand, the yolk globules are accumulated in the cytoplasm, independently of the yolk vesicle. They continue to grow during the vitellogenesis and finally by their confluence become a yolk mass which is supplied as the nutritive material for later development. The globules gave always a very faint P. A. S. reaction. Therefore, the yolk vesicles differ from the yolk globules in their origin and fate in vitellogenesis and in the role in development.

In connection with this, some consideration should be given to the cortical granules of sea urchin eggs. As has already been pointed out by Kusa (1954), these granules have much in common with the cortical alveoli of fish eggs both in chemical nature and function. The granules are also composed of polysaccharide substance combined with sulfuric acid residues (Monnè and Hardè, 1950) and break down at fertilization (Moser, 1939; Motomura, 1941; Endo, 1952). According to Monnè and Hardè (1950), the prospective cortical granules are at first scattered throughout the whole cytoplasm and migrate into the cortex during maturation. As a similar feature has been demonstrated in the prospective alveoli of fish eggs, it seems very interesting to make clear the origin of the prospective cortical granules scattered throughout the cytoplasm.

SUMMARY

1. The yolk vesicles and the yolk globules in the flounder oocyte appear to be quite independent of each other. The former seem to give rise to the cortical alveoli embedded in the cortical cytoplasm, while the latter are accumulated in the extravesicular cytoplasm and grow into a continuous yolk mass enclosed by the cortical cytoplasm.

2. During vitellogenesis, the polysaccharide substances contained in the vesicles undergo no chemical change. They seem to be neutral mucopolysaccharides.

LITERATURE

Endo, Z. (1952). The role of the cortical granules in the formation of the fertilization membrane in eggs from Japanese sea urchins, 1. *Expl. Cell Res.* 3, 406–418.

Glick, D. (1949). *Techniques of histo – and cytochemistry.* 531p. London; Interscience Publishers.

Ichikawa, O. (1953). *Cytochemistry.* (in Japanese). 478p. Tokyo; Honda Shoten.

Kusa, M. (1954). The cortical alveoli of salmon egg. *Annot. Zool. Japon.* 27, 1– 6.

Lison, L. (1953). *Histochimie et cytochimie animales.* 2e Édit., 607p. Paris; Gauthier–Villars.

Monné, L. & Slautterback, D.B. (1950). Differential staining of various polysaccharides in sea urchin eggs. *Expl. Cell. Res.* 1, 477–491.

———— & Hardé (1950). On the cortical granules of the sea urchin egg. *Ark. f. Zool.* 1, 487–498.

Moser, F. (1939). Studies on a cortical layer response to stimulating agents in *Arbacia* egg, 1. *J. Exp. Zool.* 80, 423–446.

Motomura, I. (1941). Materials of the fertilization membrane in eggs of Echinoderms. *Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ., Ser. IV.* 16, 345–363.

Yamamoto, K. (1956a). Studies on the formation of fish eggs, I. Annual cycle in the development of ovarian eggs in the flounder, *Liopsetta obscura. J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser.* VI, 12, 362–373.

———— (1956b). Ditto. III. Localization of polysaccharides in oocytes of *Liopsetta obscura. Ibid.* 12, 391–399.

———— (1956c). Ditto. IV. The chemical nature and the origin of the yolk vesicles in the oocyte of the flounder, *Liopsetta obscura, Jap. Jour. Zool.* 11, 567–577.

———— (1956d). Ditto. VII. The fate of the yolk vesicle in the oocyte of the herring, *Clupea pallasii,* during vitellogenesis. *Annot. Zool. Japon.* 29, 91–96.

———— (1956e). Ditto. VIII. The fate of the yolk vesicle in the oocyte of the smelt, *Hypomesus japonicus,* during vitellogenesis. *Embryologia,* 3, 131– 138.

PLATE I

Explanation of Figures

All figures are photomicrographs from sections of the flounder oocytes. Magnification of the figures is about 400 times.

Fig. 1. Early period of the yolk vesicle stage

Fig. 2. Middle period of the yolk vesicle stage

Fig. 3. Later period of the yolk vesicle stage

Fig. 4. Primary yolk stage

Fig. 5. Secondary yolk stage

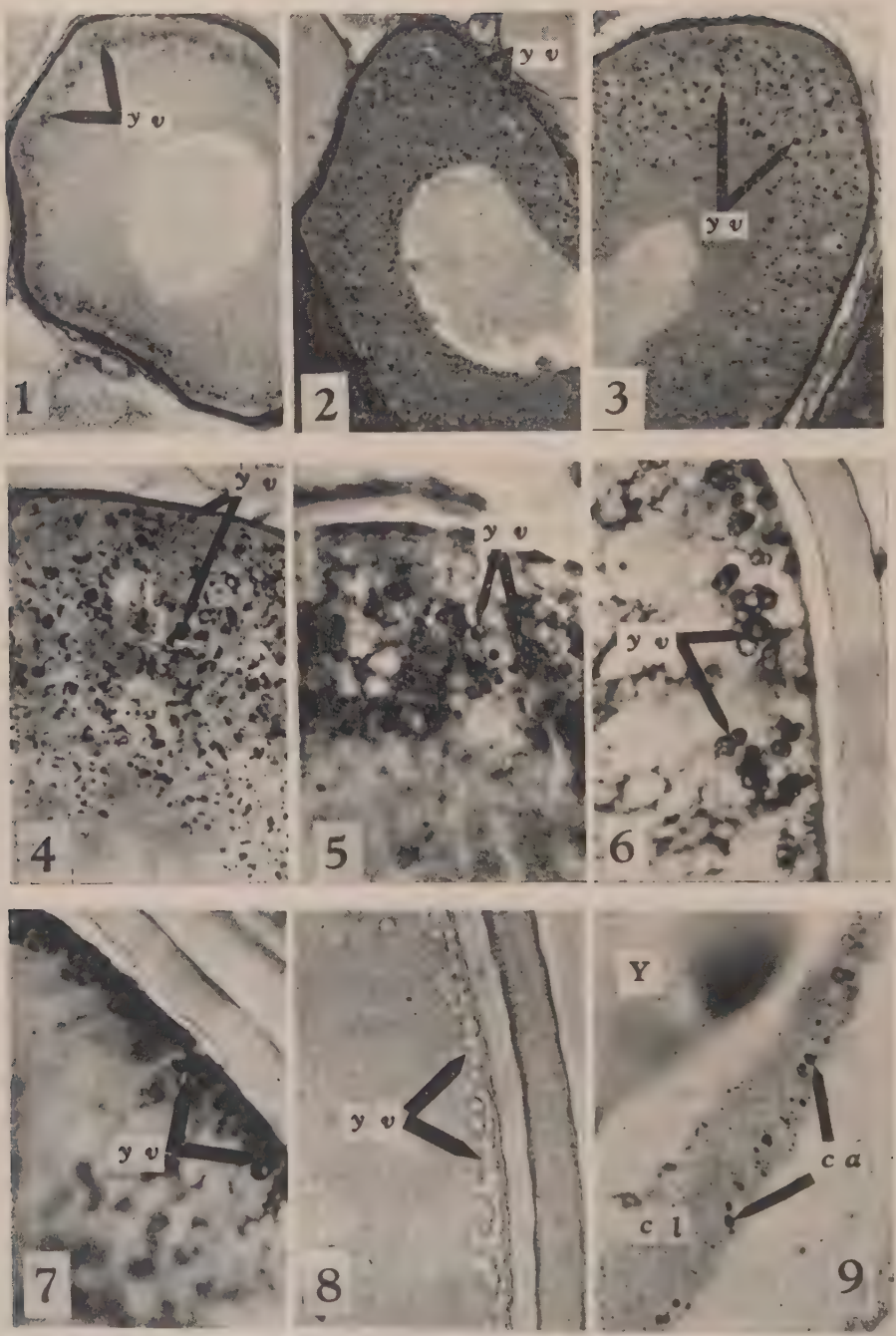
Fig. 6. Eary period of the tertiary yolk stage

Figs. 7 and 8. Later period of the tertiary yolk stage

Fig. 9. Maturation stage

All figures except 8 were made from Bouin–Allen and P. A. S. preparations treated with saliva prior to the P. A. S. test. Fig. 8 was taken from a Bouin–Allen and toluidine blue preparation.

c. a. Cortical alveoli, c. l. Cortical layer, Y. Yolk, y. v. Yolk vesicles



K. YAMAMOTO: Formation of Fish Eggs (IX)

ワカサギ *HYPOMESUS OLIDUS* の生態学的研究

第4報　石狩川へ溯上するワカサギの年令について

浜　田　啓　吉
（北海道大学水産学部発生遺伝学教室）

Ecological Study of the Pond Smelt, *Hypomesus olidus*

4. On the age of the pond smelt ascending in the Ishikari River

Keikichi HAMADA

Abstract

The pond smelt, ***Hypomesus olidus*** (*PALLAS*), ascends to spawn in the river Ishikari from the sea toward the end of May. The age of this ascending school remains unknown at present.

The writer has obtained specimens of pond smelts from the bay of Oshoro on July 31, September 3, October 3, 1952 and May 8, August 4, August 19, 1953. The investigation of these specimens has led to the conclusion that the pond smelts in the bay of Oshoro grow about 100 mm in body length during one year. On the other hand, the pond smelt ascending to spawn in the river Ishikari toward the end of May also show a body length of about 100 mm (Tables 1 & 3a). Moreover, the fishes from both localities are very similar in the number of vertebrae. The mode of the distribution of the vertebral number is 57 in both fishes (Tables 2 & 3b). Vertebrae in the vertebral column of pond smelts collected from many other localities are likely to run 55 or 56 (Sato, R. & Kato, Y., 1951).

From the above, the writer concludes that the pond smelt inhabiting the bay of Oshoro and the fish ascending in the river Ishikari belong to the same race. The fishes of this race live in the sea for a year, mature there, and ascend to spawn in the river.

緒　　言

石狩川へ五月下旬ワカサギが産卵の為に海から溯上することは既に報告された（浜田，1953a)。しかも此等のワカサギは体長の変異少く同一年令群であり，多分一年魚であろうということを述べた。しかしながら一年魚であるかどうかについては確な根拠が与えられなかつた。筆者は石狩川で孵化した稚仔は石狩川の注入する石狩湾及びその附近で生育するものと考え，忍路湾に於て地曳網により本種を採捕することを試みた結果若干の本種を得た。此等の標本の体長から湾内に於るワカサギの生長過程を，又その脊椎骨数から石狩川へ溯上するワカサギと忍路湾のワカサギとは同一の群であるという結果を得，石狩川へ溯上するワカサギは一年魚（満一年）であることを知つたのでこゝに報告する次第である。

本研究に終始御指導をいたゞいた斎藤三郎教授並びに新山英二郎助教授に厚く感謝する次第である。又標本蒐集に御協力をいたゞいた山崎為蔵氏及び信太和郎氏に感謝する。

材料及び方法

サムプルは表1,2及び3に示された通りである。何れも採捕後約 10%ホルマリンに浸漬した。体長は下顎前端から尾鰭基底迄を測定し，脊椎骨数には尾部棒状骨（Urostyle）を含め下尾軸骨（Hypural bone）は含まれない。尚本報告中に使用されるサムプル記号は表1及び2に示されたものである。

Table 1. Distribution of specimens according to the body length in millimetres, obtained from Oshoro Bay

Mark of Samples	a	b	c	d	e	f
Date / Body Length	July 31 1952	Sept. 3 1952	Oct. 3 1952	May 8 1953	Aug. 4 1953	Aug. 19 1953
35 - 39	21				1	
40 - 44	80					
45 - 49						1
50 - 54						60
55 - 59						40
60 - 64		2				
65 - 69		5				
70 - 74		1				
75 - 79			7			
80 - 84			3			
85 - 89						
90 - 94						
95 - 99						
100-104				1		

生　　長

忍路湾内に於るワカサギの体長組成の変化を追跡し，湾内に於るワカサギの生長を知ろうとしたが，表1及び図1は出現した本種の体長組成である。1952年7月31日（サムプルa）に多数のワカサギを捕獲したがその中から101尾をとり測定した（個体による体長変異が少いので測定を打切つた）。体長は 35～44mm の間にあり就中 40～44mm のものが多く101尾中80尾である。この標本を網走湖産ワカサギの体長と比較すると，網走湖産当才魚，1949年1月22日採集，45～89mm，1950年9月23日採集，30～94mm，1952年10月27日採集，35～69mm（何れも海から遡上したものを含む，浜田，1953 c）である。又極めて発育の悪いと思われる大沼産ワカサギも満1年で体長のモードは47mmにあり（浜田，1953a），忍路湾でとられたサムプルaは0才魚（当才魚）であること即ちこの春（1952年）に孵化したものであることが知られる。石狩川へ産卵の為ワカサギが遡上するのは五月下旬であり35～44mmの体長は約2ヶ月の生長を示す（忍路湾のワカサギと石狩川へ遡上するものとの関係は後に述べる）。1952年9月3日の標本（サムプルb）は8尾より採ることが出来なかつたが，体長は60～74mmにありサムプルaの1ヶ月の生長と見ることが出来る。ついで1952年10月3日の標本（サムプルc）10個体は75～84mmの間にあり，9月3日から1ヶ月の生長を示してゐる。此の後は湾内にチカ *Hypomesus japonicus*（*Brevoort*）が出現し，ワカサギと入れかわるらしく湾内で何度もワカサギの採捕を試みたがとることが出来なかつた。翌1953年5月8日には体長101mm，♂，鱗に年輪らしいもののない，1個体を得た（サムプルd）。本標本の体長は石狩川へ遡上するワカサギのそれと等しいが，遡上するものかどうかは疑わしい，何故なら精子は既に放出されたらしいからである。石狩湾内でワカサギの産卵が行われるということは何等の手がかりもなく，又石狩川以外にワカサギの遡上はなく，これに対する説明は現在は出来ない。1953年8月4日には又体長 35.5mm（性？），1個体を得（サンプルe），同8月19日には多数の標本を得た。此の中から 101個体を抽出した。その体長は 45～59mmの間にある（サムプルf）。此の標本も前年の7月31日に得られたサムプルaと同じく体長の個体差は少い。

以上が湾内に於るワカサギの生長過程であるが，石狩川へ遡上するワカサギの体長は 90～144mm の間に

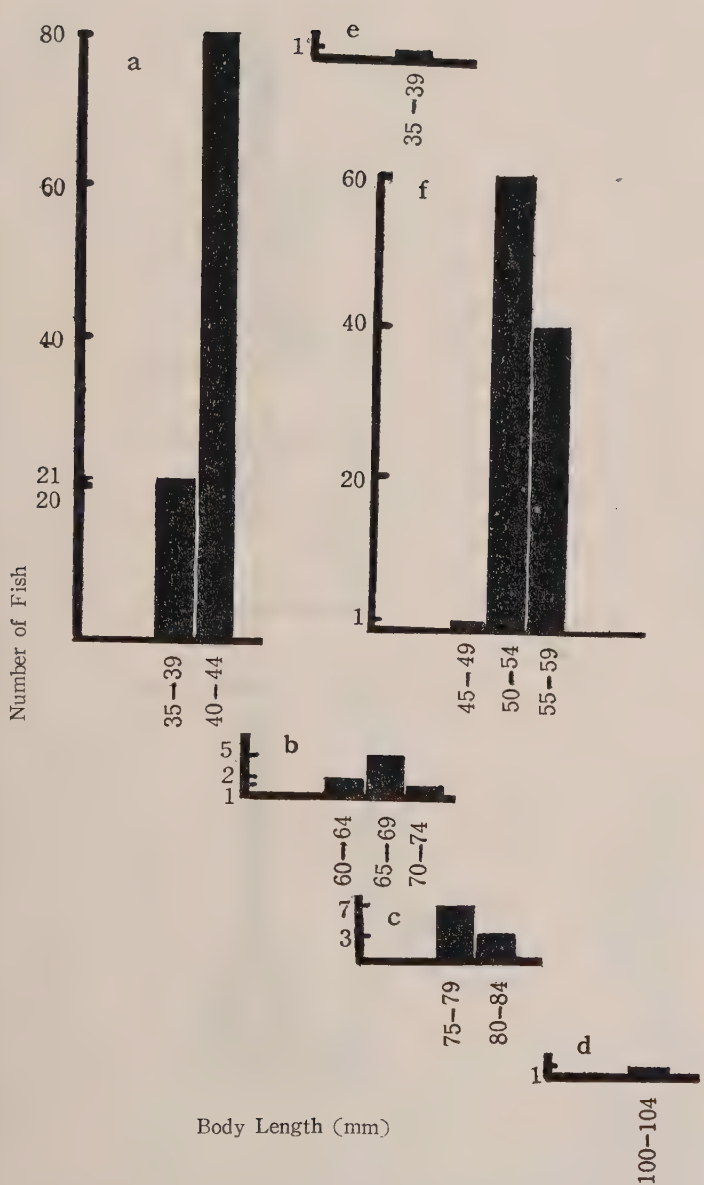


Fig. 1. Distriburion of the pond smelt obtained from Oshoro Bay according to body length in millimetres. a: specimens collected on July 31, 1952. b: specimens collected on September 3, 1952. c: specimens collected on October 3, 1952, d: specimens collected on May 8, 1953. e: specimens collected on August 4, 1953. f: specimens collected on August 19, 1953

ある（Table 3a）。サムプルcが生長し石狩川へ遡つたものとすれば10月から翌5月下旬迄の生長は約 20mmであるが，冬期間の生長の遅滞があるとしても十分に生長し得る大きさである。

各サムプルの鱗相は十分注意して観察されたが年輪は認められず，鱗の大きさの増加につれて環状線の増加があるに過ぎない。

白石（1955）によれば諏訪湖産ワカサギは1ケ年で約100mmに生長する。此の諏訪湖のワカサギとの比較によつても石狩川へ遡上するワカサギが満1年魚であることは推定される。

さて忍路湾のワカサギが満1年で石狩川へ遡上するワカサギと等しい体長になることは知られたが，石狩川へ遡上するワカサギと忍路湾に出現するワカサギが同一群であるなら石狩川へ遡るワカサギは満1年魚であることが結論される。この点を明かにする為に脊椎骨数を比較して見た。

脊　椎　骨　数

種族の指標として脊椎骨数が多くの魚種について用いられているが，湾内のワカサギが石狩川へ遡上するものであれば両者は同一の脊椎骨数を示すであろう。石狩川へ遡上するワカサギの脊椎骨数は55～58にありそのモードは57である（表3b）。Sato, R. & Kato, Y.

Table 2. Distribution of the number of vertebrae of the pond smelt obtained from Oshoro Bay

Mark of Samples / Number of vertebrae \ Date	a	b	c	d	e	f
	July 31 1952	Sept. 3 1952	Oct. 3 1952	May 8 1953	Aug. 4 1953	Aug. 19 1953
54						3
55	1					3
56	30	2	1	1		20
57	52	4	7		1	56
58	17	2	2			17
59	1					2

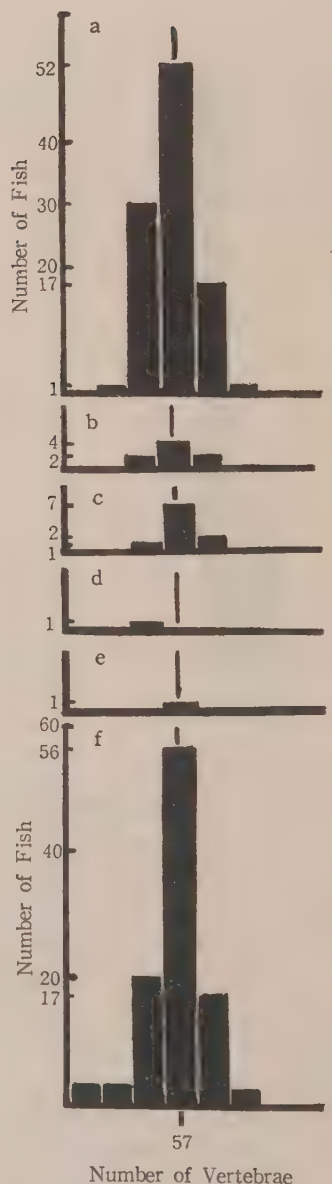


Fig. 2. Distribution of the number of vertebrae of the pond smelt obtained from Oshoro Bay a: specimens collected on July 31, 1952. b: specimens collected on September 3, 1952. c: specimens collected on October 3, 1952. d: specimens colleted on May 8, 1953. e: specimens collected on August 4, 1953. f: specimens collected on August 19, 1953

(1951)によれば陸奥湾を除き他の多くの地方のワカサギは脊椎骨数分布のモードは何れも56又はそれ以下である。又浜田（1953c）によれば網走湖及び附近の海或は湖から採られたワカサギの脊椎骨数の分布はモードが何れも56にある。又石狩古川のワカサギの脊椎骨数は極めて少い（モード53）ということも知られている（浜田1953b）。即ち石狩川へ溯るワカサギは脊椎骨数によつて特長づけられる。さて忍路湾産ワカサギの脊椎骨数は表2に示された様にサムプル

aでは55～59であり57にモードがある。b，c は共に56～59の間にありモードはaと同じく57にある。dは1個体であり前述した様に石狩川へ遡上するものかどうか疑わしいが脊椎骨数は56である。サムプルeも57の脊椎骨をもち，fは54～59の脊椎骨数をもちモードは同様に57である。

Table 3a. Distribution of specimens according to body length in millimetres, obtained from the Ishikari River on May 27, 1949

Body Length in mm	Number of Fish
90– 94	8
95– 99	36
100–104	41
105–109	23
110–114	3

Table 3b. Distribution of the number of vertebrae of the pond smelt obtained from the Ishikari River on May 27, 1949

Number of Vertebrae	Number of Fish
55	2
56	24
57	30
58	4

以上に述べた様に石狩川に遡上するワカサギは脊椎骨から見て他の地方のものとは異る。しかも石狩川の注入する石狩湾の一部にある忍路湾に出現するワカサギは石狩川へ遡上するものと同様の脊椎骨数を示す。このことは忍路湾のワカサギが石狩川へ遡上するものであるという根拠として十分なものであろう。たゞ Sato, R. & Kato, Y.（1951）によつて陸奥湾のワカサギ脊椎骨数が57～58に多いことが報告されているが，このことは忍路湾のワカサギの一部が津軽海峡を通つて陸奥湾に入つたと解することも必ずしも不可能ではないが，別群と見るのが妥当であろう。

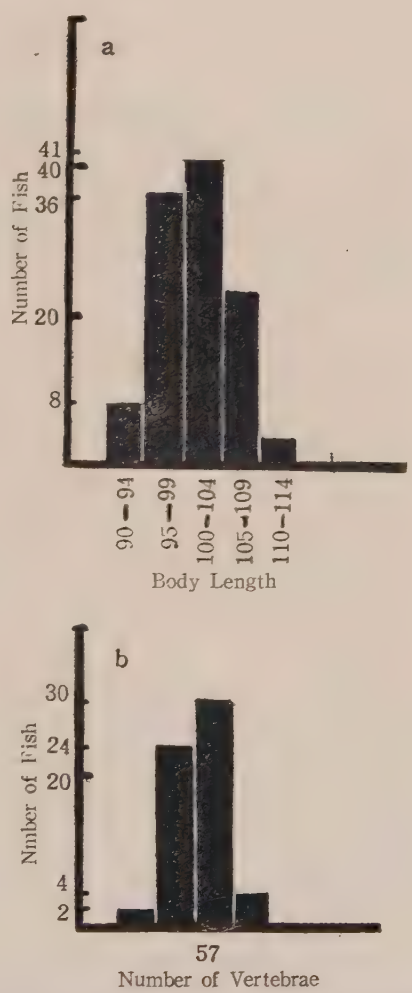


Fig. 3. a: Distribution of the pond smelt, obtained from the Ishikari River on May 27, 1949, according to the body length in millimetres. b: Distribution of the vertebral number of the pond smelt obtained from the Ishikari River on May 27, 1949

結　　論

以上各項で述べた様に忍路湾のワカサギは満1年で石狩川へ遡上するワカサギと同一の体長に達し，しかも脊椎骨数が両者ともそのモードは57という特に多い数を示すことから他地方の群とは区別され，両者は同一の群（種族）であることが結論される。更に忍路湾のワカサギは1ケ年で体長約100mmに達することか

ら，石狩川へ遡るワカサギは満1年魚であることが知られる。

引 用 文 献

浜田啓吉（1953a）．ワカサギの生態学的研究-Ⅰ．ワカサギの鱗相の地方的差異について．日水誌 19（2），75-78．

————（1953b）．ワカサギの生態学的研究-Ⅱ．石狩川の旧及び現水路のワカサギについて．日水誌 19（2），79-82．

————（1953c）．ワカサギの生態学的研究-Ⅲ．網走湖産ワカサギに於る鱗相による年令査定の不確実性と其の原因．北大水産彙報 4（1），46-53．

Sato, R. & Y. Kato (1951). Influence of Natural Environmental Conditions on the Vertebral Number of the Pond Smelt, *Hypomesus olidus* (*Pallas*). Tohoku Jour. Agr. Res. 2 (1), 127-133.

白石芳一・北森良之介・北森真栄（1955）．諏訪湖産ワカサギの成長並びにその鱗に関する研究．淡水研研究報告 4（1），17-32．

チカ *HYPOMESUS JAPONICUS* の生態学的研究

第1報 年令の推定

浜田啓吉
(北海道大学水産学部発生遺伝学教室)

Ecological Study of *Hypomesus japonicus*

I. Conclusion as to age

Keikichi HAMADA

Abstract

Taxonomic studies on *Hypomesus japonicus* (BREVOORT) have been carried out by Jordan, D.S. & C.H. Gilbert (1883), C.L. Hubbs (1925), L.S. Berg (1932) and many other authors. But the habit and the life-history of the fish still remain unknown.

The writer who is carrying out an ecological study, came to certain conclusions as to the age.

H. japonicus grows to 90 to 130 mm within a year and then spawns. Some of the fish live to the age of 3. The age is represented by the annual ring, which is formed in April (spawning season) on the scales. However, the annual ring does not show the age at the spawning season, for some of the fish are observed to have already formed the ring and in others still have not formed any at this season.

緒言

チカ *Hypomesus japonicus* (BREVOORT) はワカサギ *Hypomesus olidus* (PALLAS) と極めて近縁の種であつて，北日本からカムチヤツカ近海にかけて分布する。北海道沿岸に於ては主として四月並びに九月から十二月にかけて漁獲される。本種については Jordan, D.S. & C.H. Gilbert (1883), C.L. Hubbs (1925), L.S. Berg (1932) 其の他多くの研究者の報告があるが，何れも分類学的研究であり，其の生態については詳でない。筆者はワカサギの生態研究に際し，チカ及びワカサギの形態上の特徴を明確にする必要を感じこれを調査研究したが (1954) 更に生態上からも研究の必要を感じ本研究に着手した。現在迄年令について知り得た点を茲に報告する次第である。

本研究に際し終始御指導をいたゞいた斎藤一郎教授及び新山英二郎助教授に厚く感謝する次第である。本研究に用いた材料は北海道水産試験場樋作技師，根室湾中部漁業協同組合組合員各位，森町水産技術普及員小川裕章氏の労によるものであり，厚く感謝の意を表する次第である。尚小川氏によつて採集された森町の標本は最近問題になつているワカサギ孵化放流の効果の確認の一部として種の同定を依頼されたものであるが，標本は全てチカ *Hypomesus japonicus* であり，ワカサギ *Hypomesus olidus* の混在は全く見られなかつた。

材料及び方法

材料は表1及び2に示された如く，釧路国霧多布，1952年12月9日70個体，根室国温根沼，1953年12月15日，50個体，函館，1954年4月10日，81個体，森町，1955年4月20日，59個体，同，1954年9月14日，107個体，同，10月25日49個体，同，11月18日，71個体及び有珠，1953年7月20日，14個体を用いた。漁獲後直ち

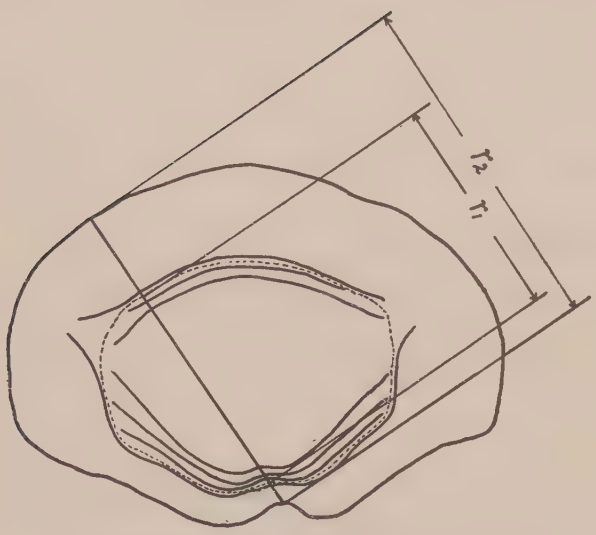


Fig. 1. Diagram of a scale for explanation of method for measuring of scale. r_1 and r_2 show respectively the growth during the first year, and for one year and several months.

Table 1. Distribution of specimens, *Hypomesus japonicus*, according to body length in millimetres

No. of Samples	1	2	3	4
Locality	Kiritappu	On-neto	Mori	Hakodate
Date / Body length	Dec. 9 1952	Dec. 15 1953	Apr. 20 1955	Apr. 10 1954
75- 79 mm			1	
80- 84				
85- 89			1	
90- 94	2		1	
95- 99	9	2	2	
100-104	12	9	15	4
105-109	9	13	15	13
110-114	12	13	11	13
115-119	1	6	5	13
120-124	2	2	4	20
125-129		1	1	13
130-134				5
135-139	3			
140-144	6		1	
145-149	11	1	1	
150-154	3	1		
155-159			1	
160-164		1		
165-169				
170-174				
175-179		1		

に約10%ホルマリンに浸漬し，実験室に於て魚体の各部を測定した。

体長は下顎前端から尾鰭基底迄とした。鱗は背鰭起部より後下方に走る1横列鱗上，側線上にある鱗（測定は此の鱗による），その鱗と鰓蓋骨後縁との中間及び尾柄の三部から剝離し，サムプル1に於てはミクロメターを幻灯機で投影し拡大率を定め同様に鱗を投影して挿図に示された方法によつて測定した。他のサムプルは顕微鏡で観察した。尚霧多布産標本総数と鱗測定個体数との不一致は鱗の脱落したものがあつた為である。

体長について

体長が年令の推定或は決定の基準となることは現在迄多くの魚種についての研究から知られるところである。

チカは表1に見られる様に体長から2つの群に分けられることがある。サムプル1は体長90～124mmに分布する1群（以後 a_1 群と呼ぶ）及び135～154mmの1群（以後 b_1 群）が見られる。サムプル2は95～129mmの1群（a_2 群）及び145mm以上の群（b_2 群）に分れるであろう（図版I, 1）。サムプル3に於ては129mm以下の群（a_3 群）と140mm以上の群（b_3 群）に

わかれる。サムプル4のみは100～134mmの間に分布する単一の群（a_4群）である。此の体長組成は年令を示すであらうという推定を我々に与える。

鱗相について

現在魚類の年令は多く鱗或は耳石に示される年輪（Annual ring）によつて決定されている。チカと最も近縁なワカサギに於ても鱗に現れる Annulus が年令決定の一手段となることが報告されている。（小林，1926；浜田，1953，その他）。

チカの鱗相は図版Ⅰの3に示される様にワカサギのそれと同一である。Annulus は環状線が鱗の外縁に平行でなく前側域（Antero-Lateral region），側域（Lateral region）及び後側域（Postero-Lateral region）に於て切断されたより小さい鱗が鱗の内部にある様な形をとる。この周囲に新しく長い環状線がこれを囲む様に形成され，此の境界が Annulus として観察される。

サムプル1ではa_1群には全く Annulus を見ることが出来ずb_1群には必ず1 Annulus が見られる（図版Ⅰ，3a）サムプル2ではa_2群中最も体長の大きい125.3mm♀及びb_2群中最も小さい147.1mm♀の2個体には1 Annulus が見られ，それより大きい3個体即ち151.2mm♀，163.8mm♀，175.6mm♀の3個体には明確な2 Annuli が見られる（図版Ⅰ，3b）。サムプル3ではa_3群中12個体に1 Annulus が見られ，b_3群中145mm♂には1 Annulusを，143.3mm♂，156.8mm♀の2個体には2 Annuli が見られる。即ち同一或は近接した体長の個体に於ても Annulus の見られるものと見られないものとがある。サムプル4は体長100mm～134mmにある単一の年令群と考えられるが112.5mm♂，123.4mm♂，110.5mm♀，101.8mm♂の4個体に Annulus らしいものが見られ，119.3mm♂，106.5mm♂の2個体には明確な Annulus が認められた。

Table 2. Distribution of Specimens, *Hypomesus japonicus*, according to body length in millimetres, taken from Usu Bay and the coast of Mori

No. of Samples	5	6	7	8
Locality	Usu	Mori	Mori	Mori
Body length \ Date	July 20 1953	Sept. 14 1954	Oct. 25 1954	Nov. 18 1954
30–34 mm	5			
35–39	7			
40–44	2	21		
45–49		67		
50–54		16		
55–59		1	1	
60–64			5	
65–69		1	27	4
70–74		1	13	2
75–79			2	28
80–84				28
85–89				6
90–94				2
95–99			1	1

年令の推定

サムプル1のa_1群が0才魚（1年未満）であるという推定はワカサギの生長と比較しても十分考えられるが，a_1群が0才魚であるとする根拠として噴火湾に於るチカの生長過程を表2に示した（図版Ⅰ，2）。サムプル5は7月20日有珠沿岸に於てイカナゴと混獲されたものである。体長30～44mmであり極めて小さい。此れが0才魚（産卵は4月）であることは明かである。このことは鱗に Annulus なく又ワカサギと比較して1年以上の生長としては小さ過ぎるからである。ついで同一湾内の森町沿岸に於て9月14日（年は異る）に採捕したサムプル6は40～74mmであり体長及び採捕時期から見てサムプル5と同様のチカの生長したものと見られる。更に10月25日に採られたサムプル7は 55～79mm（1個体のみ 95.4mm♀ 鱗に Annulus な

し）と生長し，11月18日に採られたサムプル 8 は 65～99 mm と生長している以上のサムプルの鱗には何れも Annulus がない。以上に示された群が翌年産卵期にはサムプル 3 a_3 群（表1）となるものと考えられる。更にa_1, a_2, a_4群も体長及び鱗相から 0 才魚と考える。

さて Annulus が年輪であることは次の観察によつて証明される。サムプル 1 b_1群の鱗に見られる Annulus が形成された時期の体長をa_1群の鱗の径とb_1群の Annulus の径との比較によつて推定する。表3の中r_0は挿図1に示された方法によつて測定したa_1群の鱗径である。r_1は同様にして測られたb_1群の Annulus の径でありr_2は鱗の径である。r_1は2年目最初に形成された環状線と1年目最後の環状線の中間を測定した故多少の誤差があるであろうが，r_1 と r_1 は表3に見られる様に略等しい値を示し，b_1群がr_2 の大きさの鱗をもつとき即ちr_0 なる鱗径をもつa_1群と略等しい魚体の大きさをもつときに生じたものであることが知られる。それ故 Annulus は年輪であることが推定される。

Table 3. Distribution of scale measured from 49 individuals taken on December 9, 1952. r_0 is the diameter of the scale, which lacks annulus. r_1 and r_2 explained in Textfig. 1

Age	0 Age	1 Age	
Length of r_0, r_1, r_2	r_0	r_1	r_2
1.35–1.29 mm		1	
1.40–1.44	2	1	
1.45–1.49	2	2	
1.50–1.54	3	1	
1.55–1.59	4	1	
1.60–1.64	4	2	
1.65–1.69	7	2	
1.70–1.74	6	1	
1.75–1.79	3	4	
1.80–1.84	1		
1.85–1.89	2		
1.70–1.74			
1.75–1.79			
1.80–1.84			
1.85–1.89			
1.90–1.94			
1.95–1.99			
2.00–2.04			1
2.05–2.09			1
2.10–2.14			
2.15–2.19			
2.20–2.24			3
2.25–2.29			3
2.30–2.34			2
2.35–2.39			
2.40–2.44			2
2.45–2.49			
2.50–2.54			2
2.55–2.59			1

鱗相の項に於て述べた様にサムプル 2 に於ても 1 Annulus を示すものは 0 Annulus の標本より大きく 2 Annuli の魚は 1 Annulus のそれより更に大きい。サムプル 1 の例により此れも同様に年令を示すものと推定される。

サムプル3では体長とAnnulusとの関係はサムプル 1，2 に見られたものとは異る。a_3群中にはAnnulusが見られるものと見られないものがあり，b_3群でも 145mm♂には 1 Annulus が見られ，より小さい 143.3mm♂には 2 Annuli，最も大きい 156.8 mm♀には又 2 Annuli が見られる，サムプル4に於ても Annulus らしいものが 4 個体に見られ 2 個体には明確にAnnulus が見られる。サムプル 3 及び 4 に於ける Annulus と体長の混乱は一見 Annulus が年令を示さない様に見える。しかしながら 4 月は産卵期であり熟卵をもつて居りサムプル 3 では既に放卵した個体もあつた。サムプル 1 及び 2 では体長と Annulus の関係に混乱がないが此れは漁獲時期が生長期であり，Annulus形成の時期ではなく，サムプル3，

4は Annulus 形成の時期であるからであろう。

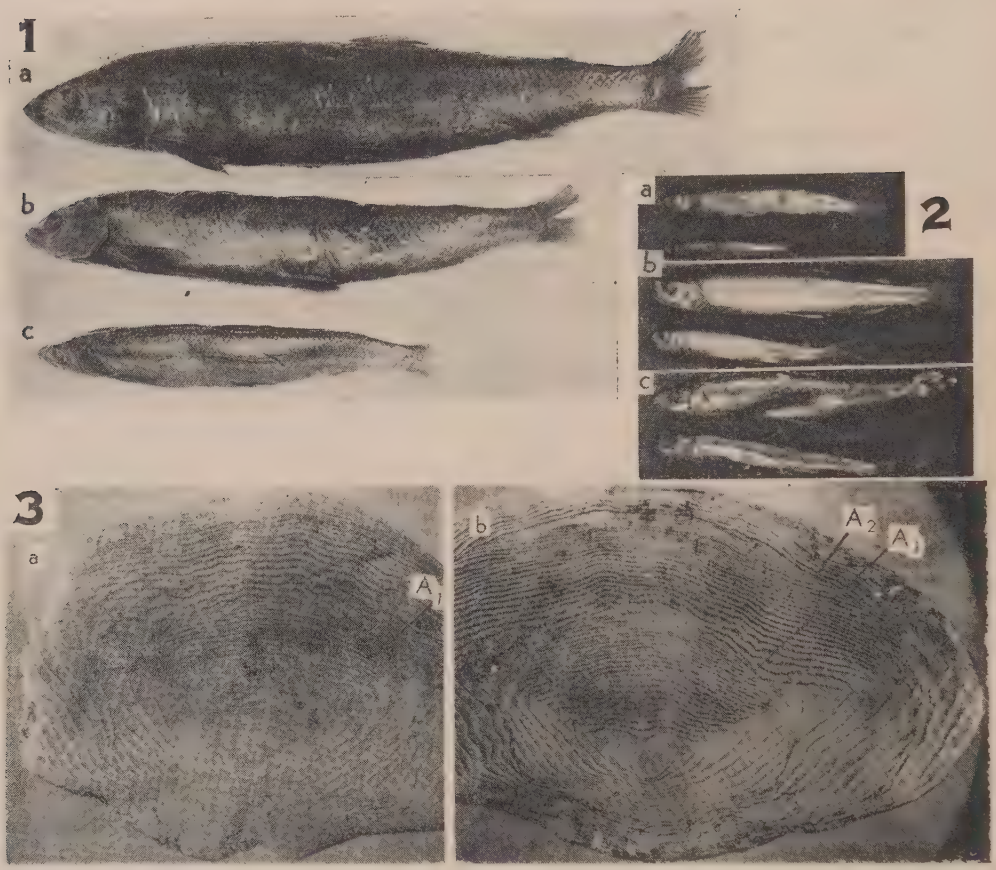
要　　約

本報告は次の点に要約される。（1）チカは1年間で 90mm～130mm位に生長し（2）1年で成熟産卵する（3）Annulus は年輪（Annual ring）であり1年間の生長を示し産卵期及びそれ以後に形成される。（4）鱗に2 Annuli を示す個体がある，即ち満2年以上の個体がある。

引　用　文　献

浜田啓吉（1953a）．　ワカサギの生態学的研究一Ⅰ．　ワカサギの鱗相の地方的差異について．日水誌 19（2），75—78．

小林久雄（1936）．　鱗相によつて判明するワカサギの生態．　科学 6（3），100—102．



K. HAMADA : Ecological Study of *Hypomesus japonicus*

Explanation of Figures

1. *Hypomesus japonicus* obtained from Or.-neto, the bay of Nemuro, on Dec. 15, 1952. a : 2-year old female 175.6 mm in body length. b : 1-year-old female 147.1 mm in body length. c : less than one year old male 109.2 mm in body length

2. *Hypomesus japonicus* obtained from the coast of Mori. a : male obtained on Sept. 14, 1954. Upper specimen 70.3 mm; lower specimen 43 mm in body length. b : female obtained on Oct. 25, 1954, upper specimen 95.4 mm, lower 65.4 mm in body length. c : specimens obtained on Nov. 18, 1954. Upper, female 94.1 mm, lower, male 78.5 mm in body length

3. Scale of *Hypomesus japonicus*. A_1 : annulus showing the age of 1. A_2 : annulus showing the age of 2. a : scale from one year old female, 144 mm in body length, obtained from the coast of Kiritappu. b : scale from the fish shown in Fig 1, a

航走採集によつて観察された1954～55年津軽海峡青函航路に於ける浮游橈脚類

前　田　礼　一
（北海道大学水産学部浮游生物学教室）

Plankton Copepods in the Tsugaru Straits, Northern Japan, as Investigated by Underway Samplings

Reiichi MAEDA

Abstract

Samplings were made with Handy Underway Plankton Catcher Model II (Motoda, 1954) aboard the ferry steamer between Hakodate and Aomori crossing the Tsugaru Straits, in every month (except June) from September 1954 to July 1955.

Among the copepods collected twenty-five species are originally inhabitants of tropical or subtropical waters (Table 2). They are transported from the south by the Tsushima Current along the Japan Sea coast of Honshu and appear in the Tsugaru Straits by being drifted with the invasion of tributary flow of this current from the western entrance of the strait.

Five species (Table 2) are cold water-preferring species, whether oceanic or neritic nature, being not associated with warm Tsushima Current. They are found when the inflow of the Tsushima Current into the strait is not prevailing.

As compared with the occurrence of warm current species of copepods off Asamushi, on the coast of Aomori Bay in Mutsu Bay (Kokubo *et al.*, 1946-1952) and in Oshoro Bay, west coast of Hokkaido (Anraku, 1953), the present data deal with ten species more of such forms than in the above two regions.

From monthly observations (excepting in June), the seasonal fluctuation in copepod community with particular reference to the appearance and disappearance of the forms belonging to the above two groups is summarized as follows:

In the middle of September, 1954, warm current species were prevalent, especially in the open pass of the strait and at the mouth of Mutsu Bay. They increased in species number with the progress of the season until the maximum was reached in the middle of October. Some of such species disappeared in early November. Diminution of warm current species was very notable in early December, and, on the other hand, cold water-preferring species were increased in species number and individual number as well from December. The observations in early January and in early February, 1955, showed that the more the decrease in species number of warm species, the more the increase of cold water species. Warm species completely disappeared in early March, while the cold species became even more prevalent. Cold species were widely distributed, covering the whole area investigated in early April and in early May. However, they were greatly decreased and remained only in small number in the middle of July, while a few of warm species again appeared in this season. The latter forms were increased gradually to late July.

It is observed that the appearance and disappearance of copepods, whether warm or cold species, generally lag in the bay water near Aomori compared with the water in the central pass of the strait.

There is general agreement of fluctuation of current indicating species of copepods with that of diatoms in the present strait reported by Hakodate Marine Observatory (1954–55).

1954年9月から1955年7月まで各月1～2回（6月欠測）函館—青森間を連絡船に便乗して簡易航走採集器II型（元田，1954）（篩絹GG58ネット使用）を曳航して採集した。曳航速度は約14節，採集器の位置は表面下数10cm，1回の曳航時間は30分間である。主に夜間航行の船を利用し，函館－青森間を7区間に分け各区間1回ずつ採集した（Fig. 1）。標本は橈脚類について種別に個体数測定を行つた（Table 1）。採集器には濾水計をつけなかつたので，正確な濾水量は知られないが，30分間曳網によつて得られた数を標準として，各区各回の採集絶対量の比較を行つた。一応完全濾過と仮定すれば（入水孔口径5cm）30分間の濾過水量は約25m³に相当する。

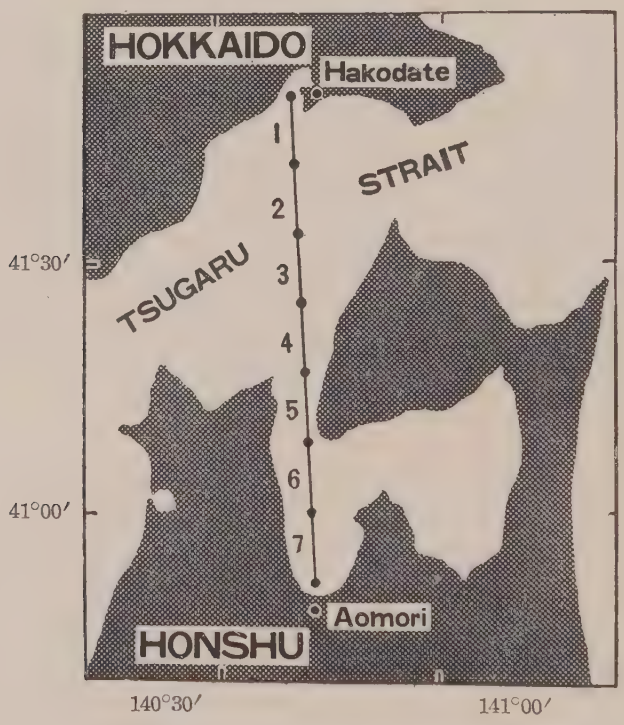


Fig. 1.
Chart showing the course of the ferry steamer between Hakodate and Aomori and the sections at which underway plankton samplings were made

I　各回に於ける主要種の組成

第1回採集（1954年9月16日～17日）：橈脚類は42種，その他動物プランクトン6種であつた。個体数は区間1及び2（30分間曳航採集中4000～6000個体）に於て最も多く，区間3～7では大凡半減し，区間3で最小を示した。暖流性橈脚類はかなり著しく19種に達し，中でも *Calanus minor, Paracalanus aculeatus, Temora stylifera, T. discaudata, Sapphirina nigromaculata, Corycaeus speciosus, C. concinnus* の各種は殆んど全区間に亙つて見られ，特に *Temora* 2種は個体数も多かつた。*Paracalanus parvus* と *Clausocalanus pegrens* の様な分布の広い種は全区間から採集された。又沿岸性が著しく，陸奥湾で周年分布する *Centropages abdominalis*（青森湾海洋生物時報，1946～52）は区間6及び7にのみ出現し，函館側及び海峡部に於ては全く見られない。出現種数は海峡部及び湾口部で最も多く26種にのぼり，函館側及び陸奥湾内殊に湾奥では少い。暖流種の出現個体数並に種数から判断し，今回の航行全域に亙り，表層は全般に対馬暖流に覆われて居り，特に区間1～4，即ち函館側から陸奥湾口部にかけて対馬暖流の影響が著しいことが示される。橈脚類以外の種では *Noctiluca scintillans* が相当数全区間に分布し，Decapoda larvaは湾口部でのみ見られた。

第2回採集（1954年10月1日～2日）：橈脚類は43種，その他の動物プランクトン7種であつた。即ち種数は前回に比して幾分多いが，一方個体数は前に比べかなり減少し，区間2を最高として青森沿岸に近づくに従い減少している。前回分布した暖流種は引続き存在し，この他著しい暖流種 *Calocalanus pavo* が区間4及び7で僅少出現した。沿岸性の *Centropages abdominalis* は前回同様に陸奥湾内でのみ採集された。暖流種 *Calocalanus pavo* 及び *Corycaeus agilis* の新出現に加え，暖水性の *Eucalanus mucronatus, E. crassus, Acartia danae* 等の増加，更に *Pleuromamma gracilis* 及び *Pseudodiaptomus marinus* の新たな出現から，前回に比して暖流の影響は大きくなつたと考えられる。出現種数は前回同様に区間2，3及び4に於て多く，両岸寄りはそれより少い。*Noctiluca* は前回同様多量に全航程に亙つて分布した。

第3回採集（1954年10月16日～17日）：橈脚類52種，その他の動物プランクトン7種が見られた。個体数は前回より増加し，函館側及び海峡部では5000内外，陸奥湾内では1500以下である。暖流種は引続き現われ *Paracalanus aculeatus* は全区間で数を増し，*Calocalanus* は *C. pavo* に加え *C. plumlosus* が出現し，両種共に区間7以外の諸区で一様にかなりの数が得られた。*Acrocalanus* 及び *Lucicutia flavicornis* も前回より増加し，*Temora discaudata* 及び *T. stylifera* の両種も引続いて存在した。更に今回新に *Euterpe acutifrons* と *Corycaeus catus* が区間1を除き全区間に出現し，前回見られなかつた *Clytemnestra scutellata* も発見された。*Sapphirina* 及び *Copilia* も引続き分布し，*Corycaeus* や *Oncaea* も全般に増加した。注目すべき点は冷水性の *Metridia lucens* が始めて北方の区間1～4に於て認められたことで，津軽海峡のプランクトン相が秋型から冬型に移り始めたことを示すものであろう。気象台の報告によれば，この時期には津軽海峡東口から冷水塊分枝が流入し始めている。併し大勢は相当量の対馬暖流が流入していると思われる。出現種は前回より多く，区間2，3及び4で優り，陸奥湾奥部に行くに従い減少し最奥部では約半数しか分布しない。橈脚類以外の種類は *Noctiluca* が幾分減少した外，前回と大差はなかつた。

第4回採集（1954年11月1日～2日）：全区間から橈脚類44種，その他5種が採集された。個体数は海峡部及び函館側で多く，4000個体内外であるのに湾口から湾内にかけて半減し，湾奥部の区間6及び7では約⅛に減少した。橈脚類は前回に比べて大きな変化はないが，全般的に暖流種の個体数が減少し，或る区間では全く消失した。函館側海区と海峡部で幾分暖流の影響がプランクトン相に現われ，陸奥湾ではその影響は極めて少い様である。冷水種は *Metridia lucens* が区間3，4及び5で僅かに分布したのみで，他の区域では見られない。種数は函館側海区並びに海峡部で最も多く（29～30種），湾口部では幾分減少し湾内部では半数以下に過ぎない。*Noctiluca* も暖流性橈脚類同様に個体数は減少し，殊に湾内及び湾奥部の区間6及び7では非常に減少した。

第5回採集（1954年12月4日～5日）：橈脚類45種，その他6種が採集された。個体数は前回に比べ湾外に於て減少し，区間相互の変動は著しくない。冷水外洋性の *Calanus cristatus* が区間2で，同じく冷水性の *Euchaeta japonica* は区間1～5で新たに出現し，10月から現われた *Metridia lucens* は湾奥部の区間7を除く全区間に見られ，冷水の影響は稍々増大し，その影響は函館側で強いように見える。之に反し，暖流種は更に減少を続ける。即ち *Calocalanus pavo, Mecynocera clausi, Candacia catula* 及び *C. bradyi* は全く消失し，*Calocalanus plumlosus* が区間1と2で僅かに残存した。又 *Temora discaudata* は全く見られず，*T. stylifera* が区間7でのみ採集された。*Setella gracilis, Euterpe acutifrons, Clytemnestra scutellata* 等も数が減り，*Corycaeus* も種数，個体数共に少くなつた。前回既に消失した *Sapphirina* と *Copilia* はやはり発見されない。函館側及び海峡部に於ては暖流種の減少によつて，全種数は前回より稍々減少したこととなり，区間6と7は逆に増加したので，湾内外の種数の相異は前回ほど著しくない。*Noctiluca* は各区間とも前回と略々同様で，区間6及び7で少量であつた。

第6回採集（1955年1月7日～8日）：区間1は欠測した。橈脚類34種，その他5種で前回に比して相当少い。個体数は更に減少し，最も多い区間でも1400個体以下で，区間2，3及び7では1000個体以下であつた。冷水種は前回区間2で出現した *Calanus cristatus* は今回発見出来なかつたか，*Metridia lucens* 及び *Euchaeta japonica* が見られた外に *Pseudocalanus minutus* が今回全区間に分布し，冷水の影響が増大したことを示す。一方暖流種は更に減少の一途をたどり，*Calanus minor* は区間2，3，6及び7に於て僅かに出現したのみである。先月迄残存していた *Paracalanus aculeatus, Centropages calaninus* 及び *C. furcatus* は完全に消失し，同じく先月迄僅かに存在した *Calocalanus plumlosus* も全く姿を見せない。更に *Temora stylifera, Candacia longimana, Setella gracilis* 及び *Euterpe acutifrons* は今回は採集されなかつた。暖水性の *Oncaea* 及び *Corycaeus* の個体数も可成り減少した。先月と同様に区間相互の出現種数の差は殆んど認められない程度である。12月には未だ相当数分布した *Noctiluca* も今回は急激に減少し，湾奥の区間6及び7では完全に消失し，区間2～5で稀薄な分布を示したに過ぎない。

第7回採集（1955年2月7日～8日）：橈脚類30種，その他6種が採集された。個体数は全般に前回より幾分多く，区間1及び2に於て乏しく，区間3から7にかけて略々一様である。9月から1月まで連続的に分布していた *Calanus minor* は今回から全く消失した。*Calocalanus pavo* が時節はすれに区間2に於て見られたが個体数は僅少である。*Euchaeta marina* 及び *Clytemnestra scutellata* も全く消失し，残存している暖流種も更に減少の一途をたどる。反対に冷水種 *Pseudocalanus minutus* は引続き全区間に分布し，*Metridia lucens* も増加し，区間7を除く全航程で採集された。又新たに寒流種 *Calanus plumchrus* が区間6以外で加わり冷水の影響が増大したことを示す。区間別出現種数は函館側で少い外は前回同様相互の差異は殆んどない。暖流の衰退は先月迄は僅かながらも残存した *Noctiluca* が全く見られなかつたことでも推測出来る。

第8回採集（1955年3月5日～6日）：区間6及び7は荒天のため採集を中止した。採集された橈脚類は20種，その他5種で前回に比べ更に11種減少した。個体数の区間による差異は少い。尚区間5で少なかつたのは荒天の影響によるのかも知れない。寒流種は更に増加した。即ち12月に区間2に於てのみ少数初めて見られた後採集されなかつた *Calanus cristatus* が，区間4で再び採集され，先月から出現し始めた *Calanus plumchrus* は個体数を増し，更に *Pseudocalanus minutus* 及び *Metridia lucens* も同様優勢になつた。先月迄僅かに採集された暖流種は全く消失し，又暖水種も著しく減少し，*Corycaeus* の如きは1種のみが僅かに分布していた。函館側の冷水は更に拡大したことが推察される。

第9回採集（1955年4月6日～7日）：橈脚類16種，その他4種が採集され，種数は先月より更に減少している。個体数は稍々増加し，区間2で稍々少く，他は著しい差異はない。先月と殆んど同じような組成で冷水種が増加した。*Calanus cristatus* は湾内，湾奥部を除く各区間から採集され，*Pseudocalanus minutus* 及び *Metridia lucens* は共に全区間に分布し，前種は湾奥に行くにしたがい数が殖え，後種は逆に函館側

に多かつた。前回まで僅かに残存していた *Corycaeus ovalis* は全く見当らなかつた。出現種数は区間3，4及び5は10種以上を算えるが，その他の区間は更に少い。今回は冷水塊の影響が更に増大し，特に海峡部に著しい様であつた。

第10回採集（1955年5月7日）：採集器流失のため，区間1～4以外は採集出来なかつた。橈脚類9種，その他1種が採集され，個体数は前回より増加した。冷水種 *Calanus cristatus, C. plumchrus, Pseudocalanus minutus* 及び *Metridia lucens* 等の個体数は更に増加し，未だ単調な冬型の組成である。種数は各区間とも非常に少い。

第11回採集（1955年7月19日～20日）：橈脚類23種，その他7種が得られた。個体数は再び減少し，区間2を最高とし，その他の海区で大きな変動はない。冷水種は *Metridia lucens* が区間2及び3で採集されたのみで，冷水の影響は非常に弱まつたことが示され，反面暖流種の出現が始つた。即ち *Temora stylifera, T. discaudata, Pontella chierchiae, Copilia mirabilis, Corycaeus agilis* 等が少数出現し始め，暖流の流勢が増して来たことを示した。種数は再び増加し，海峡部と湾口部に多く，湾内に少い。暫く見られなかつた *Noctiluca* も全区間に少数現われた。

第12回採集（1955年7月28日～29日）：橈脚類29種，その他5種が採集された。個体数は陸奥湾口で最も多く，湾内部では少い。中旬に出現した暖流種の外に，*Paracalanus aculeatus, Candacia longimana, C. catula* 及び *Corycaeus speciosus* も現われ始め，暖流勢力の増大を示す。*Metridia lucens* は消失し，冷水種は全くいなくなつた。各区間の種数は前回と同程度で，湾口部で最も多く，陸奥湾内及び函館側に少い。*Noctiluca* は中旬同様分布していた。

以上の如く，対馬暖流に乗つて津軽海峡に漂流し来る暖流性乃至は南方暖水性のプランクトン橈脚類は，7月から2月までの間現われ，出現種数の最大となるのは10月中旬である。津軽海峡中央部表面水温の1954年度の年変化（Fig. 2）（函館海洋気象台，1955）をみると，水温の最高期は9月中旬であつて，南方性橈脚類の最大出現期は之より1ヶ月遅れている訳である。

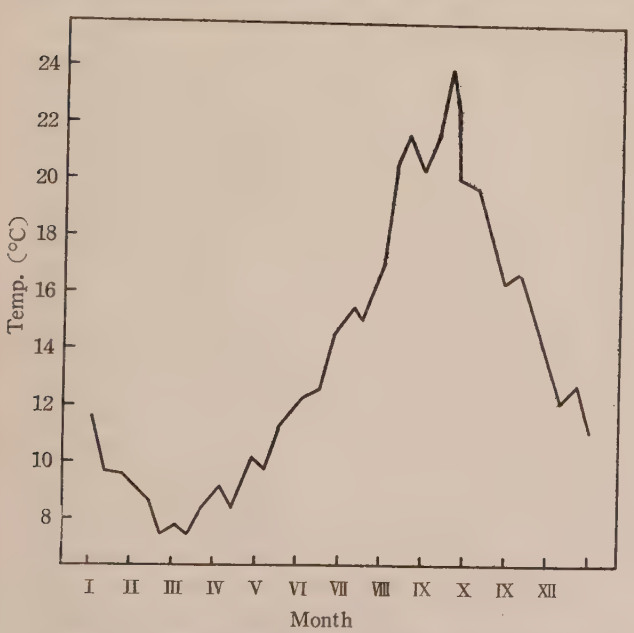


Fig. 2. Annual fluctuation of surface temperature in the Tsugaru Straits in 1954 (Hakodate Mar. Obs.)

II　浅虫沖及び忍路湾に於ける記錄との比較

本邦北方沿岸の対馬暖流々域に於ける橈脚類の周年変化については，陸奥湾奥青森湾沿岸の浅虫沖に於ける小久保等の研究（青森湾海洋生物時報，1946～52），並びに安楽（1953）の北海道西岸の忍路湾に於ける観察がある。之等によると程度の差はあるが，両湾の浮游橈脚類の衆群は周年分布する種，寒冷の頃冷水塊の張出し，或は沿岸水温の低下に伴い出現する冷水種，水温の上昇につれて現れる暖水種，秋期対馬暖流によつて運ばれてくる暖流種，その他不規則な出現をする種等に分けられ，その出現状態は年によつて多少の変動はあるが，略々規則的であることが

Table 2. Cold water and warm current copepods occurring off Asamushi, Mutsu Bay (Kokubo *et al.*, 1946–52), in Oshoro Bay (Anraku, 1953) and in the Tsugaru Straits. Asterisks indicate cold water copepods.

	Off Asamushi	Oshoro Bay	Tsugaru Straits
**Calanus cristatus*	+		+
**Calanus plumchrus*	+	+	+
**Pseudocalanus minutus*	+	+	+
**Euchaeta japonica*			+
**Metridia lucens*	+	+	+
Calanus minor			+
Mecynocera clausi			+
Paracalanus aculeatus	+	+	+
Calocalanus plumlosus	+	+	+
Calocalanus pavo	+	+	+
Calocalanus styliremis		+	
Aetidus giesbrechti	+		
Euchaeta marina		+	+
Centropages calaninus			+
Centropages furcatus			+
Temora stylifera	+	+	+
Temora discaudata	+	+	+
Lucicutia flavicornis		+	+
Lucicutia ovalis			+
Candacia catula			+
Candacia longimana			+
Candacia bradyi			+
Labidocera acuta	+		
Pontella chierchiae			+
Acartia erythrea	+		
Setella gracilis	+	+	+
Euterpe acutifrons	+	+	+
Clytemnestra scutellata			+
Copilia mirabilis	+	+	+
Sapphirina nigromaculata		+	+
Corycaeus speciosus	+	+	+
Corycaeus curtus	+		
Corycaeus rostratus	+		
Corycaeus catus			+
Corycaeus concinnus		+	+
Corycaeus agilis		+	+

述べられている。以上の2地区に対し，今回行つた津軽海峡のカイアシ脚類の出現状況を比較することは非常に興味深く感ぜられる。これ等両湾と今回の研究による津軽海峡に出現する暖流性並びに冷水性カイアシ脚類を比較するとTable 2の如くである。浅虫（1946～50年），忍路湾（1946～50年）共に5年間の資料に基いているが，今回の津軽海峡の調査は，1年未満の観察資料によるから，出現すべき種を全部網羅していないと思わなければならないであろう。

先ず冷水種について，以上の3海区を比較すると，出現種数は津軽海峡が最も多く5種，浅虫が4種，忍路湾が最も少く3種である。*Calanus cristatus* は外洋性で石狩湾で採集されるが，忍路湾には侵入しない。3海区に現われる*Calanus plumchrus*及び*Metridia lucens*はその出現時期をみても3海共区殆んど変らない。*Pseudocalanus minutus* は忍路湾に於ける出現が他の2海区より2ヶ月早い。年によつて差はあるが之等冷水種は忍路湾では通常11月～12月頃出現し始め，翌年5月～6月頃まで存在し続ける様である。

次に対馬暖流を指標すると考えられる暖流種の出現種数は，津軽海峡の今回の採集が上記の3海区中最大で25種を記録し，忍路湾及び浅虫は遙かに少く共に15種に過ぎない。この中浅虫に出現し，今回津軽海峡でみられなかつた種もあるが，之は今回の採集年限が少く，元来分布

個体数の少い種は，年によつて発見され難い事もあるのによるのであろう。同一種の3海区に於ける出現の時期は大凡等しいが，一般に暖流種は忍路湾並びに浅虫よりも，今回の津軽海峡及び部陸奥湾内に早期に出現し，遅くまで残存している様で，これは忍路湾の位置はより北方にあり，又浅虫は陸奥湾の奥部に位置する関係によるものであろう。今回津軽海峡に現われ，浅虫及び忍路湾で記録されていない暖流種 *Centropages calaninus, C. furcatus, Lucicutia ovalis, Candacia catula, C. longimana* 及び *Clytemnestra scutellata* 等は外洋性のもの，又は元来個体数の少い種である。

Ⅲ　函館海洋氣象台による津軽海峡の珪藻類の研究との比較

函館海洋気象台（函館海洋気象台旬報，1954～55）に於ては，毎月各旬毎に連絡船による海峡の表面採水中の珪藻の資料を観察し，海峡西口から流入する海流の消長を推測しているが，その結果と同期間中の橈脚類の消長とを比較してみる。同報告によると1954年7月末から8月上旬にかけて，*Hyalochaete* 亜属の増加及び熱帯外洋種の分布から，沿岸水と混合した対馬暖流は西口から流入通過して東方海域にまで拡がり，9月上旬の珪藻組成からも同様な事実が認められ，中旬には珪藻量の減少が目立ち，殊に海峡中央部に於て著しい。併し南方種の分布は前旬と変らない。今回の橈脚類の場合でも9月16日～17日に採集した橈脚類組成から，航路全域に亙り，対馬暖流が覆つている事が認められる。更に下旬になると，珪藻の南方指標種は種数，量共に増加したことから暖水塊の影響が大きくなつたことが示され，特に中央部で著しい。更に10月上旬には珪藻の南方指標種は引続き分布するけれども，例年10月中旬に見られる最強の時期は過ぎたのではないかと推察している。ところで10月1日～2日の橈脚類は新に暖流種が加わり暖水塊の影響は海峡部から湾口部にかけて強い様であつた。そして10月16日～17日の暖流性橈脚類は数量ともに増加し，本研究期間中の最大を示した。斯くの如く暖流性橈脚類は10月中旬に優勢であつたのに比べ珪藻類はこの時期には既に全般的に寒期性増殖が起つている。一方この時期に冷水性橈脚類 *Metridia lucens* の函館側区域に於ける初出現から冷水塊の影響が認められはじめ，函館側に於ける水温の低下と一致している。11月上旬になると，珪藻は全く単調な寒期性を示すようになり，気象台の観察は中止されている。橈脚類では11月1日～2日になると，10月中旬に比べて南方種は，質量共に甚しく減少し，*Sapphirina* 及び *Copilia* 等は完全に消失したが *Calocalanus* 等は未だ少数残留している。以後水温は徐々に下降の一途をたどるが，橈脚類の組成も次第に単調さを増し，1月には南方種の残存するもの極めて稀となり，反対に冷水性の *Pseudocalanus minutus* が全航程に出現し始め，2月に入ると更に *Calanus plumchrus* が加わる。3月には冷水種の出現個体数は殖え，暖流種は完全に消失してしまつた。4月の組成も，3月同様単純で変化はない。珪藻類分布の結果からは5月上旬には，未だ対馬暖流の影響は殆んど見られず，外洋寒冷水が強く，中旬になると段々に暖流分枝が流入し，下旬には海峡全域に拡大したと推察されている。一方5月上旬の橈脚類は，暖流種は全然発見出来ず，冷水種が依然として卓越していた。7月中旬には熱帯外洋性の珪藻が海峡部に拡がり始めているが橈脚類も中旬には暖流種 *Temora stylifera, T. discaudata, Pontella chierchiae, Copilia mirabilis* 及び *Corycaeus agilis* 等が再び出現し始め，珪藻同様に暖流水塊の流入を明かに示した。以上珪藻類と橈脚類の消長を比べると，橈脚類の方が多少時期にずれのある場合もあるが，全体としては略々同じように外洋水塊の流入状況を指標していることが判る。橈脚類以外のものでは，*Noctiluca* が水温の変動に対応し，秋期に多く，水温の低下と共に減少し，2月には遂に消失し，7月に再び出現した。

本研究にあたり終始指導を賜つた本学部元田教授，川村助教授並びに安楽学士に感謝すると共に，連絡船便乗について特別の便宜を供された国鉄青函局に対し感謝の意を表する。尚船上の採集作業を援助された唐牛公平，吉田仁，佐藤義明の3君に衷心より感謝の意を表する。

VI 要 約

（1） 本研究は1954年9月から1955年7月に至る間各月1回，津軽海峡青函航路の連絡船から，航走採集によつて得た動物プランクトン特に橈脚類に関して，その季節的消長を観察し，海峡西口より流入する海流の消長との関係について考察したものである。

（2） 同定された橈脚類は33属68種，その他の動物プランクトン約10種であつた。

（3） 暖流性，暖水性，冷水性橈脚類の出現状況は同時期に函館海洋気象台により観測された津軽海峡の海況とよく対応している。即ち9月中旬には19種の暖流種が分布し，特に海峡部及び湾口部に多く，この時期は全域が暖流に覆われ，特に海峡部附近に著しいことが推察される。10月初旬には更に新たな暖流種が加わり，同月中旬になると尚新しい種を加え，暖流種数は年内最大を示した。併し他方この時期に，冷水種が函館側に現われ始めた。11月初旬には著しい暖流種は消失し，他の暖流種も減少する。12月初旬は更に暖流種が少くなり，一方冷水種は新たな種を加えて優勢になる。1月初旬には残存していた暖流種の中のかなりのものが消失し，冷水種は更に種数を増し，暖流の弱化と冷水の増大を示す。2月初旬になると暖流種は殆んど消失し，反面冷水種は個体数が増加し，新しい種も加わる。3月初旬には暖流種は完全になくなり，冷水種は益々優勢になつた。4月初旬の組成は前月同様に単調で，冷水種は一層増加する。5月は前月同様の組成であるが，7月中旬（6月欠測）には冷水種は函館側の区間で僅かに残存するのみとなり，暖流種のいくつかが再び出現し始め，下旬になると新たな暖流種が加わつて，暖流の影響が再び強くなつたことが示される。

（4） 暖流性外洋種，冷水種の出現開始並びに減少消失の時期は，海峡部に於ては陸奥湾内に比べて若干早い傾向がある。

（5） 津軽海峡及び陸奥湾に於ける橈脚類の消長は，陸奥湾奥浅虫沖及び北海道西岸忍路湾に於ける消長と極めて類似するが，対馬暖流の影響は海峡に於て最も著しい様である。即ち出現する暖流種数は海峡部に於て25種であるのに比べ，忍路湾及び浅虫沖共に夫々15種程に過ぎない。

（6） 函館海洋気象台による津軽海峡の珪藻類調査の結果と比較すると，暖流性，暖水性，冷水性橈脚類の出現は夫々の珪藻類の出現と略々一致している。

引 用 文 献

Anraku, M.（1953）. Seasonal distribution of pelagic copepods at Oshoro Bay, west coast of Hokkaido. *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.* 3（3）, 187～192.

函館海洋気象台（1954～55）. 函館海洋気象台旬報 16～48. 謄写.

小久保清治外（1946～52）. 青森湾海洋生物時報 1～5.（1～3, 謄写）.

Motoda, S.（1954）. Handy underway plankton catchers. *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.* 5（2）, 149–152.

REPORT FROM THE "OSHORO MARU" ON OCEANOGRAPHIC AND BIOLOGICAL INVESTIGATIONS IN THE BERING SEA AND NORTHERN NORTH PACIFIC IN THE SUMMER OF 1955

II. Radioactivity of Sea Water*

Naoichi INOUE and Masaaki FUKUDA
Faculty of Fisheries, Hokkaido University

The measurement of the radioactivity of sea water was one of the items of the here-described oceanographic cruise (Motoda & Fujii, 1955). A litre of water was dipped from the surface at all hydrographic stations and, in addition, at st. Os 13 and 27 the water was also sampled from 50 metres depth. The position and the date of sampling are given in the table.

The water sampled was brought to the laboratory without any preliminary treatment whatsoever and used for the measurement of radioactivity in the laboratory. At the laboratory, before measurement, the water samples were treated after Miyake's carrier method (Miyake, Sugiura & Kameda, 1955) as follows: after adding 2g of solid ammonium chloride, 1 *ml* of the aqueous solution of iron alum (86.3 g/*l*) and 1 *ml* of barium chloride solution (17.8 g/*l*) to 1 litre of sample water, the water is heated to 60-70 °C with thorough stirring. A few drops of an alcholic solution of phenol-phthalein (1%) are added as an indicator. Then ammonium hydroxide solution (1 : 1) is carefully dropped until a faint pink colour appears. After two minutes' boiling, the sample is allowed to stand for one or two hours at room temperature until precipitate settles. The precipitate is filtered under suction on a round filter paper (dia. 4 cm) and dried in a desiccator.

The measurement of radioactivity was made by putting the precipitate kept on the filter paper at a distance of 13 mm under the mica window of a G-M counter. The G-M counter used was Radiation Counter, Model 32, manufactured by Science Research Instititute Ltd., Tokyo. The efficiency of the measurement of the G-M counter under the same geometrical condition was found to be 2×10^{-3} mμC/cpm. The measurement was made on January 12, 1956. At that time the back-scatterings counted 36 ± 2 cpm and all of the counts obtained from the samples did not exceed the range of back-scattering. Thus, the radioactivity of the samples collected in the present cruise was hardly recognizable with the accuracy of the present measurememt.

The authors wish to express their sincere thanks to Messrs. K. Itagaki and S. Katsuki for their kind help during the laboratory work.

* おしよろ丸北洋調査報告 No.5 (1955年度)

References

Miyake, Y., Sugiura, Y. & Kameda, K. (1955). On the distribution of radioactivity in the sea around Bikini Atoll in June, 1954. *Papers Meteorol. Geophys.* 5 (3-4), 253-262.

Mōtoda, S. & Fujii, T. (1956). Report from the " Oshoro Maru " on oceanographic and biological investigations in the Bering Sea and northern North Pacific in the summer of 1955. I. Programme of investigations and records of eye observations of sea-birds and marine mammals. *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.* 6 (4), 280-297.

Position, date and depth of sampling and radioactivity of sampled water

No. of station	Date	Position		Depth	Activity*
		Lat.	Long.	m	cpm/l
Os 1	June 26	51-43′N	160-30′E	0	0
Os 2	27	52-52′N	161-50′E	0	0
Os 3	28	53-00′N	164-00′E	0	0
Os 4	28	53-01′N	166-00′E	0	0
Os 5	29	53-00′N	168-00′E	0	0
Os 6	30	53-02′N	170-00′E	0	0
Os 7	July 1	53-02′N	172-00′E	0	0
Os 8	1	54-30′N	170-33′E	0	0
Os 9	2	55-58′N	169-11′E	0	0
Os 10	3-4	57-41′N	167-59′E	0	0
Os 11	4	58-29′N	166-32′E	0	0
Os 12	5	59-00′N	170-00′E	0	0
Os 13	6	58-30′N	173-15′E	0	0
Os 13	6	58-30′N	173-15′E	50	0
Os 14	6	56-54′N	173-17′E	0	0
Os 15	7	55-10′N	173-17′E	0	0
Os 16	7-8	53-25′N	173-38′E	0	0
Os 17	8	53-10′N	175-04′E	0	0
Os 18	8	52-50′N	176-56′E	0	0
Os 19	9	52-28′N	178-40′E	0	0
Os 20	9	52-30′N	178-54′W	0	0
Os 21	10	53-14′N	178-40′E	0	0
Os 22	10	53-54′N	178-40′E	0	0
Os 23	11	53-03′N	178-52′W	0	0
Os 24	11	53-50′N	178-52′W	0	0
Os 25	11	55-34′N	178-48′W	0	0
Os 26	12	57-00′N	178-58′W	0	0
Os 27	12	58-49′N	178-43′W	0	0
Os 27	12	58-49′N	178-43′W	50	0
Os 28	14	57-16′N	171-50′W	0	0
Os 29	15	57-27′N	170-11′W	0	0
Os 30	15	57-26′N	167-05′W	0	0
Os 31	16	57-23′N	163-58′W	0	0
Os 32	16	57-16′N	161-40′W	0	0
Os 33	20	56-04′N	163-15′W	0	0
Os 34	20	54-46′N	165-19′W	0	0
Os 35	21	53-40′N	163-31′W	0	0
Os 36	21	52-58′N	162-19′W	0	0
Os 37	22	52-15′N	161-09′W	0	0

* Back-scatterings were 36±2 cpm.

引きなわ漁船に関する航法上の研究

八反田吉常
（北海道大学水産学部船舶運用学教室）

A Study of the Interpretation of the Steering and Sailing Rules for Trolling Vessels

Yoshitsune HACHITANDA

Abstract

The new Regulations for Preventing Collisions at Sea, as are seen in the text of this paper, make considerable changes from previous Regulations particularly in Rule 26.

It is now provided that all vessels not engaged in fishing shall, when under way, keep out of the way of any vessels fishing with nets or lines or trawls. But a provisory phrase "except trolling lines" was inserted in Rule 26, when the new Regulations were issued in Japan.

There are two different and important constructions in conflict with each other in this country. These are as follows:

One interpretation holds that the phrase "except trolling lines" should not have been inserted in the Rule, because it should be understood to include the trolling lines vessels under the term "any vessels fishing with nets or lines or trawls" prescribed in Rule 26.

The other opinion holds that the vessels fishing within the meaning of Rule 26, should carry positively special signals provided in Rule 9, but it must be noted that Rule 9 contains no provision for lights, shapes, or basket to distinguish a trolling lines vessel, so that Rule 26 should not be applicable to the trolling lines vessels, no matter whether or not there is an insertion of this phrase.

Now the author made a study of this problem, and touched on the subject that special lights authorized for use by trolling lines vessels are working lights only, which "may" be used as an optional alternative, and these lights should comply with Rule 1 (b), and also have no significance as warning against any risk of collision.

These lights are "not for the purpose of warning all approaching vessels", but "for the work of the vessel herself".

Therefore the mere discovery of such a light only does not bind the persons in charge of any other vessels not engaged in fishing, to follow any particular Rule. It should be noted that a vessel under way is bound to keep clear of unknown light as a matter of good seamanship, not by any Rules provided.

Thus the author has no hesitation in saying that the latter construction is the correct interpretation of Rule 26.

緒　　言

海上衝突予防法の国際的特性及び航海の安全は，其れ等が異った国の船員によって，同一の意義に理解されるべきことを要求している。且つこれ等は各船長の指導のために発布されたものである。其れ故に本法を解釈する適当な方式は，それ等を字義通りに読むことである（Marsden p. 389 以下同じ）。

航法の原則は，航行中の各船舶は常に同等の権利義務を有し，其の時の体勢に応じて，一船を保持船とし，今一方の船を避航船と決定していることである。但し特例として，若し其の一方が明確に他方より不自由船なることが確認出来る場合，特に規定を設けて，避航保持の別を明らかにしている。

従つて特殊規定を設けていない限り，この原則に従つた行動を為さなければならず，たとえ特殊規定があつても，其の現状を明確に表示し得ないならば其の恩恵に浴することは出来ない筈である。

現行海上衝突予防法第二十六条には“引きなわを除く”なる語句が挿入されている。これがため我が国に於て，重大な相反する見解があり，法の改正問題まで起きている様である。問題が重要であるので，早期の解決が望ましい。

問題は法による権利の主張ではなく，又義務の放棄であつてもならない。要は共同の利益のために其の見解を同一ならしめて疑義を無くすることであり，あくまでも海上の衝突予防のため，如何に法を解釈し運用するかにある。

筆者はこの問題に関し考察を試みんとするものである。

I　航法は如何なる状況に於て適用されるか

航法は一船の位置及び針路を略他船が知り得る時のみ適用される（p.491）。斯る状況にあつて，始めて互に避航保持の区別を見分けられるからである。又航法は衝突のおそれを防ぐのに，何事かを為さなければ其の機会があるであろうことが合理的に明確であるか，又は明確であるべき筈の場合のみ適用される（p.391）と。其のおそれの不明確な場合は航法の適用はなく，単に運航上の危険に対して，注意が要求されるのみで，避航保持の義務関係が生ずるものではない。従つて航法上の避航保持の各の義務は，航法に規定された状況に於てのみ発動するもので，其れ以外の状況に於て一方的に其の義務を強いられるものではない。

特殊灯火や形象物を掲揚している船舶又は白灯に対して，其の他の船舶は必ず之れを避くべしとの義務は，航法上には何等規定がなされていない。其の運航が困難な事情，或は不明確な障碍に対して，衝突のおそれを生ぜしめない様に余裕を持たせるか，或はそれが何であるかを慎重に監視し対処することが船員の常務とされているのである。

航行中の船舶が碇泊船を避けるべきことは，本法航法の命ずるところではなく，船舶運用の一事としての行動であり（p.572）第四条に規定された灯火や形象物を掲げている船舶に対しても，同様の処置をすることが船員としての常務である。航法に規定されたこと以外の処置行動を採る場合は，総て一般的な船舶運用上の問題として解決すべきであつて，航法の条文に従つて採る処置ではない。

他船の存在を発見した場合，各船舶の指揮者は，第一に相手船が如何なる状況に在るか，従つて其の時の体勢が何れの条文を適用すべきかを判断しなければならぬ。若し其の判断が困難な場合には，其の期間は航法の適用はない。斯る場合に於ては，すべて第二十七条又は第二十九条が適用され，適当な船舶運用上の問題として処理することが要求されているのである。

上記の如く航法上の決定は互に明確な自他船舶の体勢を確認し得て始めて為さるべきもので，第二十一条又は第二十四条の規定を遵守すべき条件を具備して居らず，或は種々に解釈出来る表示に対して，一方的に航法上の避航又は保持の義務を決定すべきではない。

Lord Porter 曰く，第二十七条及び第二十九条は，若し第二十一条及び第二十四条が適用されないならば適用される（P.566）と，又予防法の文字通りの遂行が衝突を避けるに十分でない場合は，普通の熟練と理知のある船員が他船を安全に避けるのに為すべき総てのことを為さねばならぬ（p.565）と。これが船員の常務としての適当な船舶の運用である。

II　特殊信号の意義に関して

灯火或は形象物等に関する特殊規定は，之れを掲揚している船舶が，何等の附加物或は障碍をも受けていない他の船舶に比較して，其の運航の自由を欠く現状にあることを表示するためのものである。但しこの表示をもつて，直ちに其れ等の障碍を受けている船舶が航法上の保持船であり，必ず他船は避航船の立場に置かれると断定することは出来ない。特に第二十六条が新らしく改訂された理由もこゝにあるものと思われる。

各種の特殊信号の表示を要求又は容認されていることは，航法上の優先権を与えたものでないことは注目すべきことであり，只単に其の船が特殊の状況にあり無障碍の船舶に比し其の操縦性に困難な事情のある事を表示して，相手船の，より細心な警戒を喚起せしめんとする趣旨であつて，曳船列に特権なきと同様である。即ち航法以前の，より広き意味があり，見張り警戒に関係があるもので，航法上の避航保持を決定する要素ではない。

他船に特別行動を強制する場合，其の表示する特殊信号も亦強制的のものであるべきで且つ明確であるべきものである。任意の且つ選択的な信号の表示は何等相手を拘束出来るものではない。第二十八条後段に示されている如く，特殊な注意喚起信号の表示を認められても，之れによつて，法に規定されたこと以外の処置行動まで容認されているものでないことは明らかである。

Ⅲ 白灯炎火及び作業灯に関して

a) 白灯

白灯は，本法の各条項を通じて，単に其処に或る船舶が存在することを表示するのみで，其の船舶が如何なるものであるか，如何なる状況に在るかを表示し識別し得るものではない。只僅かに増掲灯によつて，其の船舶の大きさ或は其の概略の船首方向を説明せんと試みているに過ぎない。単なる不明な白灯の表示のみでは其の船舶の現状に就いて何等の推定をも出来るものではない。

曳かれている Bargeは，何か灯火を表示すべきことは適当な船舶運用の問題であるが，併し必ずしも規定の舷灯を掲げねばならぬことはないらしい（p. 438）と。是の見解によれば，おそらく白灯だけを掲げてもよいと云う意味ではなかろうか。即ち白灯は他船に対して，之れを避けることを要求する意味のものではなく，単に船舶の存在を示すに過ぎないことを知るのである。

白灯１個の意味するものは，Radar 上に写る第一観測点と同様で，其の船の何であるか，又如何なる針路上にあるか等其の現状の概略は，其の他の主として舷灯等の視認を得て確められるのである。未だ明確に視認出来ない危険物に漫然と接近することは，運航及び衝突の危険に対する注意の怠慢として処理されるだろう。

衝突のおそれは，相手船が予防法に従うことが出来且つ従うであろう通常の事情下で推定されねばならぬ（p. 393）とするならば，未詳の白灯１個に対して如何なる推定が可能であろうか。

Dr. Lushingtonは，単なる未知の灯火の発見は，船の指揮者をして如何なる特別規則と雖も従わせる様に束縛するものではない。併し合理的な注意と熟練で其の未知の船は何であるか，そしてどんな針路を続行しているかを確める機会を持つと同時に続いて其の時の事情に適用さるべき規則が其の船を束縛する（p. 393）と述べ，未知の灯火に対しては航法が適用されないことを明確にしている。

Alcoa Rambler 事件に於て，Lord Wrightは，避航船は其の位置がどんなものであるかを識別し，且つ他船が何を為しているか，尚或る針路上に在つたかどうか，又若しそうならば如何なる針路であつたかを知り得る位置でなければならないと云い，混雑した場所ではこの必要条件が存在するかどうかを確めることが出来ない場合もあるかもしれないが，斯る場合には航法第十九条第二十一条の適用はない（p. 507）と裁決している。避航船として行動するためには斯る条件を確める義務がある。然るに，単なる未知の白灯を視認しただけでは其の条件は充されず，其の後接近することによつて，他船との相互体勢が識別し得られて，始めて両船間の航法上の義務が決定されるのである。

一度び航法上の避航保持の関係が決定されたならば，其の後の相互位置に如何なる変更があつても最初の決定には何等の変更もない（p. 398）等である。若し白灯を視認した場合は，常に航法上必ず之れを避くべきものと解釈するならば，たとえば，A船は其の右舷船首方向にB船の白灯のみを視認して衝突のおそれある場合，直ちに之れを避くべき航法上の決定があつたものと理解し，避航行動を起して左転し始め，一方B船はA船の白灯及び紅灯を其の右舷船首に視認して避航船として右転し始め，やがてA船はB船の緑灯をも視

認し得たとした場合，如何に解釈処置すべきものであろうか。航法上の決定を其の後に判明した状況によつて変更しなければならない矛盾が起る。これは白灯のみによつて，航法上の決定がなされ得るとの誤断によつて生ずるもので，船員の通常行つている如く，白灯は単に船舶の存在のみを表示する注意喚起信号なりと解釈して，其の後の処置を採るならば，斯る矛盾は起らない。

碇泊灯，船尾灯に対しても同様である。其の後の他船との体勢を確認することによつて始めて，航法は発動するのである。確認は其の内容実体そのものではなく，其の体勢或は表示信号である。

港内にて，A船が後退中でありB船が前進中衝突のおそれある場合の如く，他船の船尾白灯を視認して直ちに，其の白灯との間に避航保持の関係が生ずるのではなく，其の船尾灯であり，しかも後退中なることを確認して，臨機処置すべきことはすでに解明せられている通りである。

b）　炎火

炎火に関しても同様，航法上他船は之れを避くべしとする論拠はない。若し有りとすれば，避航船側に於て，保持船に対して炎火を表示し注意喚起が出来ないことゝなり，第十二条の趣旨より斯ることは有り得ない。第十二条は，他船をして避けさせるための規定ではない。

他船を避くべきか，自ら保持すべきかの如き厳正を要する情勢に於て，炎火の如き任意規定によつて，之れを処理せしめるが如きは，混乱の原因となるものである。各船舶が航法上如何なる位置に在るかを確認するのはあくまでも，法規によつて強制された灯火等の表示によつてのみ決定すべきもので，任意に表示し得る灯火等によつて決定すべきものではないと考える。総ての任意信号は単なる注意喚起の意味を有する以外のものではない。

c）　作業灯

漁業用の作業灯は，本法第九条6項によつて容認されている灯火であつて，其の性質上光力の強い白灯が主となるであろうが，其の光力が特に強大であるの理由だけでは，特殊の表示であるとは認め難い。而かも第一条2項の禁止事項は重要である。規定された強制灯火を妨げ，又は其の視認を困難ならしめるが如き性能のものであつてはならない。即ち航法上の行動は必ず規定された強制灯火又は形象物によるべきことが，同項により容易に推知し得るのである。避航保持の義務は絶対強制のもので，任意に表示し得る作業灯の如きものに左右され得る性質のものではない。

作業灯は，他船に対して注意を喚起するため，又は衝突の危険を指示するためのものではなく，自船の作業上必要なものであり，其の目的上其の射光範囲は甲板又は海面即ち灯火より下方を照明する構造のものであるべきで，其の上方にも光源が開視する様なものは正しい使用法とは云い難い。

第九条6項は，第一条2項に対して，立法上例外規定であると解釈出来るそうであるが，第十二条も同様例外規定となり，且つ同条は別個に独立した1個条を構成しているのであるから，其の意義は，より強いものと考えざるを得ない。而るに炎火の表示は，敢くまでも規定の強制灯火を妨げる如きものであつてはならないことは，一般船員がすでに遵守して居り，予防法解釈上当然のことであり，常識とされているところである。新予防法第一条に於てあらためて之れを強調されたのである。

若し作業灯のみの視認をもつて，其の漁撈中なることを確認すべしと命ずるならば，漁撈中を表示するため特に定められた各種漁船灯火の必要性は甚しく薄弱となり，又何故に之れを強制灯としなかつたのであろうか。

前記の如く予防法は一度び発動されると，其の規則は必ず守られるだろうと仮定する権利と理由があり，且つ其れが破られると仮定して行動する者は無い筈である（p. 402）。このことは互に接近しつつある両船は，避航保持の何れの立場に在るかを確認していると推定出来るからである。単なる未知の白灯や炎火等の視認だけでは，互の立場を何等推定することは出来ない。

従つて，白灯のみを掲ぐる小舟は，他船の接近に対して，其の運航を停止すべしとするは早計ではなかろうか。勿論白灯のみの小形櫓櫂舟の如きは，其の行動が甚しく緩慢なものであるから，其の行動を停止まで

低下しても実害は殆んど起きないと考えられるが，たとえ結果がかくの如しとしても，積極的に停止すべしとする論は採るべきでない。航法第二十一条は，避けらるべき船舶は，其の針路と速力を保持すべしと規定している。又航法は水上に静止している船に適用されるかどうか疑わしい，法は両船共対水速力を持つていると仮定している（p.501），と説明している。

IV 引きなわ漁船が，其の表示を要求又は容認されている灯火形象物に関して

漁船が漁撈に従事中は，漁具の如き障碍物のため其の操船が著しく不自由であるので，他の航行自由なる一般船舶は，之れを避けるべきことを新しく第二十六条に規定された。

第二十六条の漁撈中の漁船とは，Any vessels fishing with nets or lines or trawls で総ての種類の漁船を含むものであろう。但し法の目的である衝突のおそれを防ぐためには，相手船に対して，其の漁撈中なることを明示する義務を負う。若しこれが不明確ならば，他船に対して其の権利を主張し，第二十六条の恩恵を受けることは許されない。従つて同条の意図する漁船と見做されるためには，昼夜を問わず明確に其の漁撈中なることを識別し得る表示をしなければならない。

引きなわ漁船の掲揚し，表示し得る信号次の如し。

1. 第九条2項に規定された，一般動力船又は帆船と同様の灯火
2. 同条6項に容認された炎火及び作業灯
3. 同条7項及び8項に該当する信号　　の3場合である。

即ち上記中第3は別として，第1及び第2の場合が，一般船舶と異つた事情即ち漁撈中であることを表示し得る特別信号と理解し得るか否かにあると思われる。

先ず第1に関して，第九条にその2項として引きなわ漁船の項が，新しく規定されたことは重要である。而かも一般船舶と同一種類のものを規定されたことは注目すべき点である。若し立法者に，引きなわ漁船をも第二十六条の漁船中に含ませる意図があるならば，殊更らに漁船たることの識別を不可能ならしむる如き第2項を設ける必要がなく，又昼間“かご”の掲揚も認むべき筈である。他に何か特別な理由があるのであろうか。

第2即ち第九条6項の表示に関しては，前節に於て検討した如く，これ等が任意規定であり，何等他船をして，漁撈中であることを確認せしめる強制力を有するものでなく，且つ漁撈中であることのみを表示する特殊信号と断定する理由はない。

第九条中漁撈中の漁船として，引きなわを特に除外していない第7項を文字通り解釈すれば，引きなわ漁船も亦，之れに含まれるものと考えられ，従つてこの場合のみ，昼間“かご”1個の掲揚が要求せられている様であるが，現実には斯る引きなわ漁撈はあり得ない。即ち昼間に漁撈中なることを表示する唯一の“かご”の掲揚は全く許されていないことは重大である。

尚8項に関しては，特に第二十六条に関係あるものとは思われない。

昼間視力により，引きなわ漁撈中である現実の作業を確認した場合は，当然第二十六条が適用される筈であるとの見解があるが：—

航法適用に関する節に於て述べた如く，航法は但し書きの必要な或る場合のみ適用されるとする如き斯る不明確な選択的なものではない筈である。明確な表示は相手船に対する厳重な義務である。遠距離より其の現状を必ず確認せしめるためにこそ，各種の灯火，形象物が規定されているのである。引きなわ漁船自身，如何なる条件下ならば，相手船が，自船を引きなわ漁撈中であることを必ず視認していると，判断し得るのであろうか。上記の見解下では，引きなわ漁船は常時保持船としての立場で行動するであろうし，一方相手船は漁船たる其の現実を確認し得ない限り，徒らに操船に混乱を生じ，衝突の危険の誘因となるのは必然である。

又漁法の現実を視認して後，航法を適用すれば十分であると解するならば，何故に“かご”や各種の特殊

灯火を制定する必要があつたのであろうか。他船に対して漁業の実体確認を要求しているものでないからこそ，第九条が特に制定されたのではなかろうか。現実に其の困難な状況を視認した場合臨機処置すべきことは船員の常務であり，航法上命ぜられたものではない。

結　　語

第二十六条に漁撈中の漁船に対して，他船は之れを避くべきことを，新らしく規定されたのは，漁撈中は常に漁具の操作のため，其の運航が阻害されていることゝ共に，魚群を追つて其の針路及び速力に変動の多いことも其の根拠の一つではないかと考えられる。

旧法に於ても，延なわを延ぶるときは，一般航行中の船舶と同様の灯火を掲揚表示することを命じていた。この煩雑さを敢えて要求した理由は，其の延ぶる期間は，曳船列と同様の状態に在り，航法適用上特に差し支えあるものとは認めなかつたためではなかろうか。現行第2項も同様の趣旨より規定されたものと理解される。若し引きなわ漁船も亦，其の他のなわ，網漁船と同様の不自由性を認めるならば，何故に新法に於て，延なわを延ぶるの語句を削除して，新らしく第2項として規定する必要があつたのであろうか，而かも第3項と何故に区別する必要があつたのであろうか。曳き船の如き状態にあり，航法適用上左程の困難性なく，其の他の漁船との間に第二十六条適用上区別する必要ありと認めた結果ではなかろうか。こゝに特に第九条2項を規定した理由ありと思考する。

若し引きなわ漁船も亦第二十六条の漁撈中の漁船に含まれるとするならば，之れが表示を要求されている第2条規定の各種航海灯を如何に解釈すべきものであろうか。

外国漁船との関係であるが，外国の Troller が果して特に操船上我が国のものと異つた装備がなされているかどうか，一例として，International Maritime Dictionary（p.799）によれば，Trollerに関し大略次ぎの記載がなされている：——

Troller には，擢ぎ舟，帆艇，及び機動艇があり，最も大きなもので長さ 45 ft，馬力 100 に及ぶものがあり，乗員は1名乃至10名，鮭鱒及び鮪，鰹，鯖等の青魚漁業に従事し，漁撈中の最良の速力は4～5ノットである。

其の漁撈方法は Brittany の French Tunny boats は，両舷側で2本の poles を装備しており，北大平洋岸の鮭鱒引きなわ漁艇は2組み，即ち両舷側に 20 ft の bow poles と，30 ft の amidship poles，及び船尾に別に1本の pole を張り出し，外側 lines は平均 60 ft，内側 lines は平均 40 ft. を流して居り，餌は主としてギ餌である。動力船では5本乃至7本の lines を使用しているのが，最も普通の状態であり，引き寄せ用として，短い lines をとり付けている。

以上の例より見て，勿論他の総てを律することは出来ないが，特に日本のものと大差あるものとは考えられない。

以上に検討した如く，引きなわ漁撈中の漁船は，何等其の漁撈中なることを明確に表示する本予防法上の方法が規定されていない。斯る船舶に対して，一般航行船舶が之れを避ける義務ありとするならば，其れ等の船舶の指揮者は，其の判断に困乱を生じ，反つて衝突の危険を誘致する原因となろう。

尚引きなわ漁撈中は之れを引きつつある間は，操船上左程の不自由はないが，漁具を甲板上に採り入れる際のみ，相当の困難が伴うことはすでに知られている通りである。

特殊灯火，形象物に関して，規定がないとされている“いか釣り，鰹釣り”漁船に対しても，同様の解釈が出来る様にも思われる。未だ問題は残るが若し強いて言えば，之れ等漁船は第3項に含まれ得ないとは断言出来ない。

従つて，第二十六条中の漁撈をしている漁船の中に，引きなわ漁船は含まれるべきものではなく，当然現行の“引きなわを除く”の語句は殊更らに削除する必要はない。削除すれば反つて，之れを含んでいるものと解釈され，航法適用上混乱が予想される。法は衝突予防指導のためのものであるから何れとも解釈出来る

字句を残すべきでない。法の解釈は，相手に疑念を抱かせないこと，そして実際に衝突予防上有効であるかどうかの観点においてなさるべきである。

尚引きなわ漁船に対する漁撈中の特殊灯火制定に関しては，別個に考慮すべき問題である。

又原文とは相違した字句の挿入或は削除を云々まるならば，其の他の個所にもあることであり，本条に限つた問題ではなく，且つ本法制定当時の説明にもある如く，日本の法律として公布されたもの故，完全な直訳は困難であろうし，其の解釈上疑義を残さず，而かも国際的な相違点がなければ問題はない筈である。ただ公の機関を通じて，国際会議に於けるこの点に関する討論は十分究明する必要があろう。

何れにしても，本問題早期の解決に一助ともなれば幸である。

文　　献

McGuffie, K. C. (1953). *Marsden on Collisions at Sea.* 882p. 10th ed. London; Stevens. Ltd.

René de Kerchove (1951). *International Maritime Dictionary.* 946p. New York; D. Van Nostrand, Inc.

水産動物筋肉中の有機燐酸化合物に関する研究

第2報　鯉肉中の Creatine phosphate の定量に就て

斎　藤　恒　行・新　井　健　一
（北海道大学水産学部水産化学教室）

Studies on the Organic Phosphates in Muscle of Aquatic Animals

II. On the determination of creatine phosphate in muscle of carp

Tsuneyuki SAITÔ and Ken-ichi ARAI

Abstract

(1) The method, presented by Miyazaki et al. (1954), was used quantitatively in the study of creatine phosphate in muscle of carp.

(2) From the present experiments that method was recognized to be reliable for quantitative determination.

(3) The determination was continued for two years. It was observed that the contents of creatine phosphate in muscle of carp varied considerably with some physiological conditions and that the values were low as compared with mammalian muscles.

既に第1報に於て著者等は鯉筋肉中の adenosine diphosphate (ADP), adenosine triphosphate (ATP) の含量を測定するに当り，その定量法の検討とその測定結果とを報告した。[1]

動物組織中の creatine phosphate (CP) の定量に就ては，Fiske & Subbarowの方法[2]や Voges-Proskauer 反応を応用した Ennor & Rosenberg の方法[3]があり，又 Alkseeva は Jaffé 反応を利用する秀れた方法を提唱し更に宮崎，内田等[4]は哺乳類の生筋に対する応用に就て詳細な報告を行つている。又最近ではイオン交換樹脂に依る Abood の方法[5]等も紹介されている。

著者等は鯉筋肉に就て宮崎，内田等[4]の方法を応用し，二，三の知見を得たのでこゝに報告する。

実　験　方　法

(1) 試　料

i) Dehydrated creatinine: 小宗薬品K. K.

ii) 合成 creatine phosphate (Na塩): Ennor & Stocken 法に依る[6]

iii) 養殖鯉: 体長20～30cm, 体重 300～400g

(2) 試　薬

i) 7.7% ammonium molybdate (10N H_2SO_4 溶液)

ii) 飽和 picric acid

iii) 10% NaOH

iv) 指示薬: methyl red

(3) 測　定

i) 標準 creatinine 溶液：0.1N HCl 溶液に 0.1mg/100cc 濃度に溶解，発色した。

ii) 合成 CP は水に溶解し直ちに NaOH でアルカリ性とし，$Ca(OH)_2$で飽和した10%$CaCl_2$を添加，混在する無機燐を沈澱除去して，その上澄液に就て発色した。

iii) すでに報告した adenosine polyphosphate の場合と同じく[1]，養殖鯉は可及的低温に於て筋肉をメスで切りとり，10倍容の4% $HClO_4$ 及び少量の海砂と共に冷却してある乳鉢中で擂潰，濾過して抽出液となしその1～2 cc に就て発色した。

発色の方法は宮崎，内田等[4]の方法に依り，先ず上記試料液に$\frac{1}{10}$容の7.7% ammonium molybdate 溶液を加え室温にて30分もしくは 50°Cで5分間分解を行う。分解終了後 methyl red 一滴を指示薬として中和し次いで10% NaOH 0.4 cc，飽和 picric acid 4 ccを加え25°Cで20分呈色させる。呈色後水で全容を20ccに稀釈し直ちに島津光電光度計（510mμ）又は島津分光光度計（520mμ）で比色定量する。

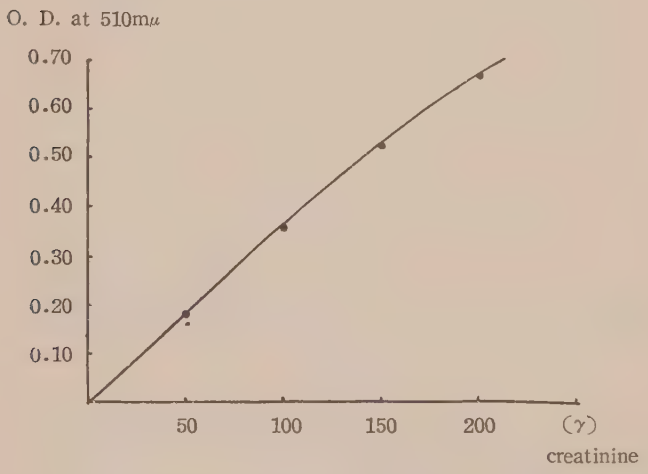


Fig. 1. Relationship between the concentration of creatinine and extinction (Photoelectric colorimeter)

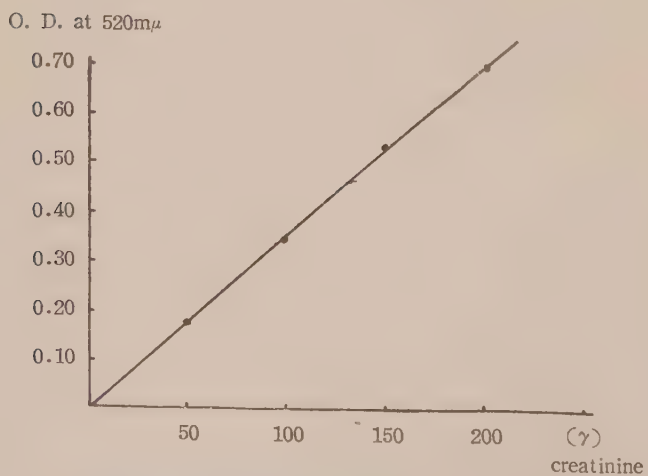


Fig. 2. Relationship between the concentration of creatinine and extinction (Spectrophotometer)

実 験 結 果

Harvey[7]がすでに報告した様に，比色定量を光電光度計によつて行う場合は creatinine 濃度と呈色（吸光係数）の相関関係は Lambert-Beerの法則に従わない。これは特に creatinine の高濃度に於て著るしい。即ち Fig. 1に示す様に creatinine 100γ 以上の濃度に於ては直線的関係が認められない。他方分光光度計によるときはFig. 2に示す如く全く直線的関係が認められた。

感度は光電光度計を使用した場合は0.5～5γ/cc.（終末溶液），分光光度計を使用した場合は 0.2～10γ/cc（終末溶液）である。いずれも creatinine についてでありCP としては1.866倍となる。

宮崎，内田等の場合と同じく誤差は1%内外，操作は極めて簡便であつた。

従来広く利用されている Fiske & Subbarow法[2]及び Ennor & Rosenberg 法[3]と本方法との比較を，合成CP及び鯉筋肉抽出液に就て行つた結果は第1表及び第2

表に示す如くである。

Table 1. Comparison between Fiske & Subbarow's and Miyazaki & Uchida's methods
(Synthesized CP, mg/cc; muscle ext., mg/g wet wt. muscle)

Sample		Fiske & Subbarow's method	Miyazaki & Uchida's method
Synthesized CP	I	0.138	0.136
	II	0.140	0.145
Muscle extract	I	2.54	2.54
	II	1.72	1.76
	III	2.84	2.93
	IV	1.85	1.95

Table 2. Comparison between Ennor & Rosenberg's and Miyazaki & Uchida's methods
(mg/g wet wt. muscle)

Muscle extract	Ennor & Rosenberg's method *	Miyazaki & Uchida's method
I	0.93	1.00
II	2.03	2.11
III	1.09	1.12
IV	1.39	1.29
V	0.62	0.57

* Analytical data by Yoshimura & Shibata[8]

Table 3. Contents of creatine phosphate in carp muscle
(mg/g wet wt. muscle)

Month	1954	1955
Feb.	1.00 3.05 2.44 1.97 0.74* 0.55*	2.93 2.54 2.20 0.95 1.13
Mar.	1.06 0.27* 0.51* 1.19 1.23 0.43*	
June	2.35 1.95 0.37* 0.57* 2.32 1.64	
July	2.60 2.29	
Aug.	0.37*	
Sept.	0.57* 1.14 0.90 1.09	0.90
Oct.	1.95 2.52 1.64	0.97 1.64 1.13 1.29
Nov.		0.98 0.93
Dec.	2.34 1.76 1.56 2.01 2.35	0.94

* fatigue

即ちこれらの方法はいずれも良く一致した値を示した。尚筋肉抽出液に対する合成 CP の添加試験の結果は，本方法では回収率98～100%，Fiske & Subbarow 法では98%を示した。従つて宮崎，内田等の主張する様に，本方法は操作が簡便である上に迅速測定を可能とする利点をもつており，又鯉筋肉抽出液に就て充分応用出来る事を認めた。

以上の結果から著者等は宮崎内田等の方法に依つて，2年間にわたり鯉筋肉中の CP の含量を測定した。その結果を第3表に示す

考　　察

本反応に於て反応陽性の物質は-CO•CH_2-結合を有する化合物であるとされている。その中特に glucose に依る影響が懸念されるけれども，分解過程終了後充分冷却し且抽出液を対照とする事に依つて防止出来るといわれている[9]。又この呈色が発色温度に依つてかなり影響されるから[10]，著者等は 25±1°C を保つて一定時間発色せしめ，非常に再現性ある値を得る事が出来た。

高エネルギー燐酸化合物の中特にCPは不安定であつて，動物筋肉中で死後急速に分解するという事実は Bendall[11]や佐々木藤巻等[12]の報告で述べられている。著者等の2年間にわたる鯉筋肉中のCP保有量も，大きな変動をともなつて得られた。これは明らかに不安定なCPに対して，各個体の生理条件が複雑に影響しているためと考えられる。特に疲労状態にある個体では，著るしい CP の減少が観察された。又著者等の得た結果に依れば，死後鯉筋肉に於ては ATP．ADP の減少に遙かに先立つ CP の減少が観察され[13]，従来の定説[11][12]

に合致している。

尙第3表の値を総合すれば鯉筋肉中のCP保有量は，大体1.00～2.50 mg/g 筋肉湿重量であるといえる。佐々木，藤巻等は鯉筋肉に就て 0.50 mg/g の値を報告しているが，著者等の分析結果はより高い値を一般に示している。しかしいずれにしても家兎，モルモット等の哺乳動物と比較するときは，鯉筋肉は低いエネルギーレベルにあるといわねばならない[11]。

要　　約

水産動物筋肉中の有機燐酸化合物に関する研究の一環として creatine phosphate の定量を行うために，定量法として宮崎・内田等の方法を鯉筋肉に応用した結果，適当な方法である事を認め，更に2年間にわたつてその定量を続け，鯉筋肉中のCP保有量はかなりの変動をともなつており，一般に哺乳動物のそれより低い値を示す事を知つた。

尙本研究を行うに当り，定量法その他に就て御懇切な御指導を賜つた札幌医大生理学教室永井寅夫教授，宮崎英策助教授，内田幸喜氏に深謝する。

文　　献

1) 斎藤恒行・新井健一（1955）. 北大水産彙報 6, 228.
2) Fiske, C. H. & Subbarow, Y. C.（1929）. *J. Biol. Chem.* 81, 629.
3) Ennor, A. H. & Rosenberg, H.（1952）. *Biochem. J.* 51, 607.
4) 宮崎英策・内田幸喜・佐藤寛（1954）. 札 医 誌 5, 300.
5) Abood, L. G.（1956）. *Science* 123, 545.
6) Ennor, A. H. & Stocken, L. A.（1948）. *Biochem. J.* 43, 190.
7) Harvey, G. R.（1953）. *Nature* 171, 1125.
8) 吉村克二・柴田猛 （未発表）
9) 萩原武美雄（1954）. 薬 学 誌 74, 488.
10) 岡田裕彦 （1953）. 医学と生物 28, 264.
11) Bendall, J. R.（1951）. *J. Physiol.* 114, 71.
12) 佐々木林次郎・藤巻正生・古城健二・田中敏夫（1953）. 農 化 27, 725.
13) 斎藤恒行・新井健一（未発表）

THE FORMATION OF MAGNESIUM-AMMONIUM-PHOSPHATE CRYSTALS IN CANNED SEA FOODS

I. The Conditions of the Formation of Crystals in Canned Sea Foods

Eiichi TANIKAWA, Yoshio NAGASAWA and Takashi SUGIYAMA
Faculty of Fisheries, Hokkaido University

Crystals of magnesium-ammonium-phosphate are sometimes found in various canned sea foods. Their presence has been reported in canned shrimp[1], in canned salmon[2)3)], and they have also been found in canned crab and canned cod[8] in the U.S.A. In Japan, they have been found also in canned seasoned bonito[4] and canned tuna[5]. As marine products, Guillerm[6] has found them in Nuoc-man of French India. Amano[7] has found the crystals in cooked juice of sardine, dried salted shark meat, fish-shoyu or in nutrient media of *Pseudomonas fluorescens* and *Clostridium fissum*.

The crystals have been identified by various investigators as hydrated magnesium-ammonium-phosphate or "struvite" with the chemical formula $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$[8)9)]. These crystals are hard and colorless, and though harmless, they are frequently mistaken by the consumer for minute broken glass. Their presence, therefore, has a definitely adverse effect upon the marketing of the canned products. The crystals in large size have been found recently in canned crab which was processed in a floating cannery. The crystals which were found in canned crab of land cannery were small, therefore no marketing claim occurred.

The authors have studied the mechanism of the formation of the "struvite" crystals and have reached some interesting conclusions. As Amano[7] stated a few years ago, the formation of the crystals is considered to be inevitable under the presence of magnesium, ammonium and phosphorus.

Experimental

The authors have observed the existence of the crystals which are visible and are tangible to finger and tongue, or are microscopic in size by the following treatment. Visible crystals on the surface of parchment paper in canned crab or on the surface of the meat of canned products, were picked up and put on a slide glass. The sizes and shapes of the crystals were observed microscopically. Invisible crystals were also raked up from the same surface with a platinum loop and put on a slide glass, and observed under the microscope. Visible crystals formed in the liquid portion of the cannd foods were gathered as follows: An aliquot of the liquid portion was centrifuged, 5 cc of water added to the precipitate and centrifuged again, and the treatment was repeated three times. The last precipitate was observed under the microscope (×600). The crystals in the last precipitate were ascertained to be not crystals of sodium chloride by

dissolving in 1% nitric acid solution and adding 1% silver nitrate solution. Invisible crystals in the juice of the canned foods were observed under the microscope.

Experimental Results

(1) *The size of the crystals which can be detected by the naked eye or by tangibility*

The following results were obtained. (1) The visible crystals (Planero crystals) having the smallest size are 60～100 μ, and microscopic crystals (Crycto crystals) are 17×5 μ in size. (2) The visible crystals in the juice of the canned crab are also 60～100 μ and the shape is needle like as shown in Fig. 1. (3) There are many microscopic small crystals in the juice of which the size is 15×5 μ in average. (4) The crystals in the upper transparent part of the juice are invisible, but there are many microscopic small crystals having irregular shape of 4.3×2.1 μ in size. The number of the crystals in the juice was 10^6～2×10^6 per cc according to Thoma's haemacytometer. (5) The size of crystals which are raked up from the surface of parchment paper and which are sensible to the end of the tongue or teeth is about 100 μ, and those which are tangible to the finger tip were above 150 μ. Those crystals can be seen by the naked eye with close observation.

Fig. 1. Visible crystals in the juice of the canned crab (550×)

(2) *Conditions of the formation of the crystals*

As above stated, there are always crystals having visible or microscopic size in the juice of canned crab. Here, the authors have detected the existence of those crystals in the juice of other canned marine products, e g., canned boiled salmon, saury, mackerel, etc.

In canned mackerel, all of five cans examined included microscopic crystals. In canned salmon, four or five cans had microscopic crystals, but one can had no microscopic crystals. In canned saury (mackerel-pike), there were also no microscopic crystals. In nine of the cans there were visible crystals. All the cans which had no visible crystals were prepared by the training factory of our Faculty by employing city water throughout the course of the processing period.

(3) *The difference of conditions between the cans containing crystals and those containing no crystals*

Yamada et al[10] have recently said that there is no difference between the washing by fresh water or sea water, and between rapid cooling or slow cooling after the pro-

cessing of canned foods. As previously observed, the reason for the difference of the formation of the crystals in the canned food of same kind of fish are an enigma. However, the present authors have found a remarkable interesting difference of relative viscosity between the cans in which crystals had found and those in which no crystal had formed as shown in Table 1. As seen in Table 1, in the juice having larger value

Table 1. Relative viscosities of liquid portions in the cans containing crystals and those containing no crystals

Kinds of can	Factory	Relative viscosity	Crystal	
			Visible	Microscopic
Salmon	Floating cannery	2.1	none	less
	Land cannery	2.5	none	less
	Training factory	2.8	none	less
Saury	Training factory	2.8	none	much
Mackerel	Training factory	2.8	none	much
Crab	Floating cannery	1.4	Much of large crystals	much
	Land cannery	1.4	Much of small crystals	much
	Training factory	1.4	Much of very small crystals	much

of relative viscosity there is no visible crystal, or there are some microscopic crystals. But in the juice having smaller value of relative viscosity, for example, in canned crab, there are many visible or microscopic crystals. This fact may show, as Nagai[11] has said, that the visible or microscopic crystals are difficult to crystallize out in the colloid-like solution. In canned fish meat, the reason for the larger value of relative viscosity of the juice, is the gelatinization of the collagen of fish skin.

(4) *The relation between the crystal formation and amounts of magnesium, phosphorus and ammonium contents in canned crab meat and other canned marine fish*

Phosphorus exists in fresh lobster meat in the range from 0.13 to 0.16% in the form of inorganic phosphorus and 0.26 to 0.3% in the total phosphorus content, and 0.05~0.12% of the inorganic phosphorus in the pickle of canned lobster[12]. The present authors have analyzed the amount of phosphorus content of the pickle and that of the meat in canned crab, and have obtained as shown in Table 2.

Table 2. Magnesium and phosphor contents in canned crab meat

	Solid portion			Liquid portion		
	Soluble (%)	Insoluble (%)	Total (%)	Soluble (%)	Insoluble (%)	Total (%)
Mg	0.018	0.089	0.106	0.004	0.004	0.008
P	0.055	0.086	0.146	0.093	0.076	0.177

According to Hollett[12], the concentration of magnesium varied from 0.0227 to 0.0234% in the meat of fresh lobster muscle, and in the pickle of canned lobster was in the range of 0.010 to 0.028%. In other raw fish meat, 0.58% in shark meat[13], 0.55% in Anko fish (*Lophius litulon JORDAN*), 0.76% in mackerel[13], 0.62% in Nibe fish. The authors have analyzed the magnesium content in the meat and in the pickle of canned crab, and have obtained the results shown in Table 2. According to the authors' previous experiments[14], the concentration of volatile basic nitrogen which is mainly ammonia nitrogen is 8～12 *mg%* in fresh crab meat, 9～10 *mg%* in fresh mackerel meat, 4～14*mg%* in fresh Atka-mackerel meat. According to the data of Reed[15], in fresh lobster meat the amount of ammonia is approximately 0.005%. The concentration of the ammonium ions was 0.010～0.035% nitrogen in the pickle of canned crab (*Paralithodes camtschaticus*).

The amounts of magnesium, phosphorus and ammonia content necessary for the formation of crystals must be above a certain definite minimum quantity which will be described below, and the minimum quantities of those components exist in many marine fish meat. Especially when the sea-water is used in the procedure of canning fish meat, the amount of magnesium increases. According to Hollett[12], sea-water of 3.5% salinity contains 0.132% magnesium; furthermore the concentration of magnesium in the pickle and in fish meat in the can became often more than doubled by using sea-water in at least two steps of the canning procedure. In canned crab in which the amount of magnesium content exists above the minimum quantity needed to form the crystals, it often occurs that neither visible nor microscopic crystals have been found in the can. This fact may perhaps be due to the difference of relative viscosity of the juice of canned foods.

(5) *The microscopic crystals exist in canned marine products in the preparation of which sea-watar has been used*

As seen in Table 1, various canned products of salmon, mackerel, saury and crab which were prepared at the training factory of our Faculty were made by using city water. In those cans, visible crystals were not found. That is to say, the use of fresh water prevents the formation of the visible crystals, because the amount of magnesium needed to form the crystals in the raw fish meat exists below the minimum concentration.

(6) *The difference of the formation of crystals in canned products*

It has been said that the size of the crystals in canned crab which was prepared at land canneries is smaller than that prepared in floating canneries. This fact may also be noted in Table 1. The largest size of crystals in canned crab which was prepared in land canneries was 2×0.1 mm; on the other hand, the largest size of those from the floating cannery product was 5×2 mm. But the size of crystals from products of the

training factory of our Faculty is very small. However, microscopic crystals are found in the juice of canned crab of land caneries or from the training factory. Those facts are considered to be due to the difference of the velocities at which the cans were cooled after the processing. These facts were ascertained in the lately reported experiments which were carried out in vitro.

Summary

In a canned product containing magnesium, ammonium and phosphate ions, precipitation of $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ will continue until equilibrium is reached between the precipitate and the concentration of the solution of the constituent ions. In vitro minimum concentration of magnesium of 0.018% combines with the minimum concentrations of magnesium of 0.013% of ammonia and 0.07% of phosphorus. This result agrees with the observation of Hollett[12] that the magnesium content of pickle is onethird or less that of ammonia or phosorus.

When the minimum concentration of constituent ions exists in canned products, especially in the pickle of small relative viscosity, e.g. in canned crab, the magnesium-ammonium-phosphate crystals visible or microscopic in size, are formed in the juice of the canned products. In this case, if the viscosity of the juice is large, e.g., that of canned salmon, saury, mackerel etc., the formation of the crystals is prevented or the size becomes microscopic. The viscosity of the juice of fish meat canned with the skin becomes viscid after the processing as a result of the gelatinization of the collagen of the skin. If the canned products are rapidly cooled, the size of the crystals is small, but the number is great; on the other hand, if the cans are slowly cooled, the size of the crystals is large, but the number is small. Those facts will be demonstrated in the later experiments.

Literature cited

1) Purcell, C. S. & Hickey, C. H. (1922). *Analyst* 47, 16-18.
2) Manley, C. H. (1931). *Ibid.* 56, 808.
3) James, C. H. (1933). *Ibid.* 58, 222.
4) Kimura, K. & Amano, K. (1941). [*Utilization of marine products*] 249p. Tokyo; Suisan-sha. (Japanese).
5) Era, S. (1933). [*Experimental report on the handling of winter tuna. Collection of report on canned tuna in oil.*] 19p. Tokyo; Jap. Assoc. Cann. Tuna. (Japanese).
6) Guillerm, J. (1931). L'Industrie du nuoc-man en Indochina. Exposition Coloniale Internationale. Paris.
7) Amano, K. (1950). Suisan Kenkyu-shi. (*J. of Fishery Science*) 40 (1), 11-16. (Japanese).
8) Clark, E. D. & Clough, R. W. (1925). *Pac. Fisherr.* (23), 11-12.
9) Ayres, V. (1942). *Chem. Abst.* 36, 38662.
10) Yamada, H., Tokuda, T., Hagiwara, N. & Takano,N. (1954). *Rept. Res. Laborat.* Nippon Suisan Co, Ltd. (7), 35-38.
11) Nagai, M. (1935). Panphlet of Pacific Ocean Fishing Co., Ltd.
12) Hollett, A. (1943). *J. Fish. Res. Bd. Can.* 6 (2). 183-193.
13) Morgulis, J. (1931). *J. Biol. Chem.* 93. 13.
14) Tanikawa, E. et. al. (1955). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 21 (6), 397.
15) Reed, G. B. & MacLeod, D. J. (1924). *Contr. Canad. Biol.* 2, 1-30.

イカ完全利用に関する研究

第15報 スルメ製造に関する研究（其の七）
雨イカ防止に関する研究

谷川英一・長沢善雄・金石和哉・杉山　隆
（北海道大学水産学部水産食品製造学教室）

Studies on the Complete Utilization of Squid
(*Ommastrephes sloani pacificus*)

XV. "Rained-on Dried Squid" ("Amaika") and Methods for Preventing the Occurrence

Eiichi TANIKAWA, Yoshio NAGASAWA, Kazuya KANAISHI and Takashi SUGIYAMA

Abstract

During the sun-drying of squid meat, if rain occurs, the surface of the squid meat reddens and becomes glossy, the thickness of the squid meat lessens, the cephalic part somewhat blackens and the podia part loses the suckers. Squid meat which shows those appearances is called "Rained-on dried squid", ("Amaika"). The cause of the occurrence of "Amaika" is as follows: When it rains, the relative humidity of the atmosphere has already become high (95–100%), accordingly the meat decomposes rapidly; pH value of the meat turns gradually from pH 4.5 to 6.5 in late period shifts to alkaline side. The pigment cells under the epidermis dissolve and the pigment extrudes when the meat is alkaline, therefore the surface of the squid reddens. The squid meat protein which is dissolvable by water is dissolved out by rain water, therefore the dried squid meat becomes thin. The thin dried meat remains as a fibrous meat, which becomes easy to split lengthwise. The slime which is derived from the decomposed substances of squid meat covers all the surface of the body of squid and becomes glossy.

In order to prevent the occurrence of "Amaika", Kokichi Oshima has fixed the pigment cells by acetic acid and magnessium sulphate. But when it rains continuously, the acetic acid is washed out and the effect on prevention of the meat will be reduced.

The authors have tried to fix the pigment cells under the epidermis of squid and to prevent the decomposition of the meat by means of dehydroacetic acid. Furthermore the authors have tried to prevent the washing out of the reagent added by a kind of surface active agent, "span-20" (Sorbitan monolaurate), and to prevent the dissolving out of the protein of squid meat by covering the squid bodies under a polyethylene sheet. By the above-described methods, the occurrence of "Amaika" can be prevented.

雨イカというのはイカを調理してスルメに乾燥する途中において雨にあたったものをいう。雨イカの状態は雨が降る時はすでに湿度高くイカ肉質の分解速かで，腐敗を生じ，肉質のpHも4.5から6.5位までになっている。時にはアルカリ性になり，このため皮下の色素細胞内の色素は流出し，肉面は赤味をおびるにいたる。又雨水にあたるため，魚体肉蛋白中可溶性のものは溶解し，肉の厚さは段々薄くなる。従って肉繊維のみが残るようになり，これを乾燥しても肉の薄いスルメが出来，縦にも裂け易くなる。又このようなスルメは胴部は赤褐色となり，脚部は黒褐色となり，その吸盤は殆んど脱落する。又胴部，脚部共に肉蛋白の分解による粘質物の表面で乾固して附着している状態となる。このようなスルメ製品は検査等級も五等品とな

り，輸出品とはならない。毎年約10万貫程度のものがこの製品となつている。

若しこの場合雨水に直接あたつていなければムレ[1]の状態となる。

雨イカを防止する方法としては大島等[2]の醋酸を用いて肉質を酸性にし，色素の流出を防ぐ方法があるが，この方法では雨水による水溶性蛋白の流出を防ぐことが出来ないし，従つて肉繊維の弱くなる恐れがあり，又醋酸の流れ出すこともある。

著者等は先ずこの雨イカの発生の機構を明らかにし，次にその防止法としてイカの皮下の色素細胞を固定して色素の流出を防ぎ，且つ肉質を防腐してアルカリ性になることを防ぎ，又水溶性蛋白の流出を防ぐためポリエチレン・ハウスを用いることを考案し，これを実験室内及び実地に実験し，一応成功を収めたのでこゝに報告する。

I　雨イカ発生に対する温度の影響

スルメ製造中高温多湿の時はムレイカを生じ，雨天の場合は雨イカを生ずることは前述の如くである。然るに雨天の日は大気中の湿度はすでに高く（関係湿度100%に近い），従つてこの場合湿度の差異よりも温度の差異が雨イカ発生に如何に影響するかを検討すべきである。

(1) 試料及び実験方法

函館沖で漁獲された鮮度良好な秋イカ（10月頃のもの）を試料に供した。これをスルメ製造時と同様に処理した後，胴部のみを前報[3]に報告したような恒温恒湿装置内に吊下し，これに人工的に一定温度の水を灌水し得るようにし，その灌水量を 60～100 $mm/cm^2 \cdot hr.$ とし，関係湿度は 90～95% に保ち，温度のみ25°Cと 15°Cの如く変えて雨イカ発生の状態を調べた。

雨イカの状態の判定はムレ状態判定[1]の時と同じく，揮発性塩基窒素（V.B.-N）量，pH，インドールの検出（ペーパークロマトグラフ法による）並びに色素細胞の状態[3]（150倍拡大）及び官能的検査によつた。尚重量変化をも測定しておいた。

(2) 実験結果

前記の如くして行つて得た実験結果は第1表及び第2表の如くである。

第1表により明らかなようにイカ肉の重量は（灌）水を吸収して膨潤し，約1.2% 急激に増加するが，その後平衡に達する。V.B.-N量はイカが灌水（実験的雨水）に曝されると表面のV.B.-Nは流出されるため一度急激に減少するが 24 時間以後では漸増する。又 V.B.-N 量 45mg% 以上でインドールが検出され始めた。色

Table 1.　Change of squid meat left at 25°C, R. H. 85～90%

Leaving time (*hr.*)	Weight of squid (*g*)	Temp. (°C)	R. H. (%)	V.B.-N (*mg*%)	pH	Indol	Condition of pigment cells (Tachiki's grade)[3]	Organoleptic test
0	197.0	25	85	16.7	5.1	−	(A)	Very fresh
4	210.0	25	85	16.0	5.5	−	(A)	Fresh
24	214.0	25	85	16.5	5.3	−	(D) (E)	Pigment cells dissolved, the surface of the body reddened. More or less abnormal smell
48	214.0	25	85	43.4	6.0	+	(F)	Elasticity of the meat diminished. Bad smell
72	214.0	25	85	59.1	6.7	+	(F)	Putrefactive smell remarkable

Table 2. Change of squid meat left at 15°C, R. H. 95～100%

Leaving time (*hr.*)	Weight of squid (*g*)	Temp. (°C)	R. H. (%)	V.B.-N (*mg%*)	pH	Indol	Condition of pigment cells (Tachiki's grade)	Organoleptic test
0	184.0	15	95	10.0	5.7	−	(A)	Very fresh
24	230.0	16	95	22.0	5.5	−	(C)	Appearance unchanged, meat softened, more or less putrefactive smell. Pigment cell began to dissolve.
48	230.0	18	95～100	24.0	5.4	±	(D) (E)	Putrefactive smell. Surface of squid reddened and slimy
72	230.0	15	95～100	50.1	6.4	+	(F)	Remarkable putrefactive smell
96	232.0	15	95	105	7.1	+	(F)	Completely putrefied

素粒は48時間後には完全に崩壊して線状となり，立木氏によるスルメ鮮度による色素細胞の標準[1]から云つても完全に「雨イカ」の状態となつている。即ち25°C (R.H. 95%)では48時間後位から「雨イカ」となる。

又第2表の温度15°Cの場合をみるに，灌水によりイカ重量は増加するが，24時間後には恒量となる。V.B.-N量，pHは何れも48時間以内では余り変化はなかつた。V.B.-N量は24時間後より急激に増加した。色素細胞は72時間後には著しく崩壊し，線状となり，「雨イカ」の様相を呈している。官能検査の結果では48時間後では臭気は感ぜられないが，色素細胞はやゝ溶出し，肉質は軟化する。併し72時間では明らかに腐敗臭を発し，イカの体の表面は赤色となり，表面に粘質物を生ずる。更に96時間では完全に腐敗し，臭気も著しい。インドールは75～80時間後より発生する。これらの結果から温度15°C, R.H. 95%では72時間後に雨イカの様相を呈するようになる。即ち「雨イカ」はムレイカと同じように肉中のV.B.-N量が30*mg%*，pH 6.0以上となつた時にその様相を明らかに呈するものであり，その色素細胞の状態で明らかに区別することが出来る。即ち色素細胞は崩壊し，流失して線状となる。而して多湿度（R.H. 90～95%の場合）の時は25°Cで24～30時間，15°Cでは72時間で完全に雨イカの様相を呈するにいたる。この点からみても雨イカの発生は温度により著しく影響されることが判る。従つて夏季雨天の場合は降雨中にイカを24～30時間以上おけば必ず「雨イカ」となる。

II 急速に各含水量まで乾燥したイカの灌水（降雨）による変化

イカ肉の含水量と腐敗性との関係については既に明らかにした。即ち50～60%の含水量まで急速に乾燥すればその腐敗速度λ(γ)は生イカの場合の1/10になることをみた[3]。こゝで著者等はイカを急速に約70,50,30%に夫々乾燥して灌水中においた場合の諸種の変化をみた。

(1) 試料及び実験方法

函館沖で漁獲された鮮度良好な秋イカをスルメ製造時と同じように調理し，室内で乾燥し水分含有量約70,50,30%とした。イカ肉の水分含量は乾燥度(γ)を求めることにより算出した[3]。これ等各種含水量の異なるイカを温度25°C, R.H. 80～90%の恒温恒湿室内に吊下し，灌水温度17～20°C，灌水量60～100 *mm/cm²·hr.* の環境中におき，一定時間毎に魚体重量，V.B.-N量，pH，細菌数等を測定した。

(2) 実験結果

前記の如くして行つて得た実験結果は第3～5表の如くである。

Table 3. Change of squid meat having about 70% water-content which has left in falling water

Leaving time (*hr.*)	Weight of squid (*g*)	Temp. (°C)	R. H. (%)	V.B.-N (*mg%*)	pH	Bacterial count	Condition of pigment cells (Tachiki's grade)	Organoleptic test
0	98	25	80	–	6.3	–	(A)	Surface dried. Pigment cells was complete.
20	125	25	80～85	25.4	6.1	27×10^3	(C)	Meat absorbed water, and swollen. Meat is more hard than raw squid meat. Odour and colour of the meat and pigment cells are as well as the raw squid.
44	145	25	80～85	12.6	6.3	35×10^5	(E)	Meat somewhat softens. Smell other than fresh fish smell began to grow. Pigment cells dissolved out.
58	159	25	80～85	32.0	7.5	70×10^6	(F)	Complete putrefactive smell. Pigment cells dissolved out. Surface reddened.
Raw	164							

Table 4. Change of squid meat having about 50% water-content which has left in falling water

Leaving time (*hr.*)	Weight of squid (*g*)	Temp. (°C)	R. H. (%)	V.B.-N (*mg%*)	pH	Bacterial count	Condition of pigment cells (Tachiki's grade)	Organoleptic test
0	48	25	80	34.7	6.0	96×10^2	(A)	Meat dried. Pigment cells was complete, and as well as raw squid.
24	87	25	85	24.9	6.2	22×10^4	(B)	Meat absorb water and swollen. Odour of the meat and pigment cells are as well as raw squid.
48	104	25	85	27.9	6.6	67×10^4	(D)	Smell other than fresh fish smell began to grow. Pigment cells began to dissolve.
72	113	25	85	34.6	6.6	25×10^6	(E)	Complete putrefactive smell. Pigment cells dissolved out, and surface reddened. Some pigment cells remained unchange.
Raw	98							

Table 5. Change of squid meat having about 30% water-content which has left in falling water

Leaving time (*hr.*)	Weight of squid (*g*)	Temp. (°C)	R. H. (%)	V.B.-N (*mg%*)	pH	Bacterial count	Condition of pigment cells (Tachiki's grade)	Organoleptic test
0	24	25	80	22.0	6.1	30×10^3	(B)	Meat dried. Pigment cells were as well as raw squid.
24	24	25	80～85	8.7	6.3	41×10^3	(C)	Meat somewhat swollen, and softened. Colour of the surface was turbid.
48	74	25	80～85	6.8	6.4	15×10^4	(C)	Meat swollen and softened. Meat was not elastic. Pigment cells began to dissolve.
72	74	25	80～85	6.0	7.0	29×10^5	(D)	Meat was as well as after 48 hours.
96	74	25	80～85	—	—	—	—	—
120	76	25	80～85	6.7	7.4		(E)～(F)	Meat softened, putrefactive smell. Pigment cells dissolved out. Surface reddened.
Raw	138							

第3～5表より明らかなように，各種含水量にまで乾燥したイカが灌水中におかれた場合，何れもその重量は増加する。然しその変化は乾燥度（含水量）によつて異なる。即ち含水量の少ない場合，即ち30%のイカ肉では48時間後に始めの重量の200%となり，平衡状態に達し，その後の重量変化は少ない。然し含水量50%及び70%のイカでは灌水によりその重量は次第に増加し，72時間後になつても平衡に達しない。48時間後におけるイカの重量は50%の含水量のものでは217%，70%含水量のものでは148%となつている。これを夫々生鮮の時の重量と比較すると，含水量30%，50%，70%のものは夫々48時間後54%，106%，92%となり，後二者は乾燥前と同じ状態となる。V.B.-N量は含水量70%及び50%のイカでは24時間後に急激に減少し，48時間後に至り増加し始める。然し含水量30%のイカでは72時間後まで減少し，それ以後に増加し始める。このようなV.B.-N量の変化は灌水により吸水し，そのため分解して生ずるV.B.-Nが溶出し流出するため一旦減少するものと考えられるが，細菌数の増加によつても明らかなように，イカ肉質の分解が進行すればV.B.-N量の溶出量に比し生成量が多くなるため後期に至り増加するものと考えられる。pH及び細菌数の変化は70%及び50%の含水量のイカ肉では漸次増加し，その傾向には大差が認められない。然し含水量30%の場合にはその変化はおそくなる。

色素細胞の顕微鏡検査及び官能検査結果よりみるに，各種含水量のイカが灌水中に放置された場合，雨イカになるまでの時間は含水量30%のイカでは120時間後，含水量50%及び70%のイカでは夫々72時間後及び58時間後である。即ち同一条件で，生イカが48時間後に雨イカとなる[2]となることと比較して含水量の少ないもの程，雨イカ発生までの時間が長くなる。又一応乾燥して含水量の少なくなつたイカ肉の色素細胞の流出状態は生イカ[1]の場合と多少異なり，化学的及び官能検査の結果よりみて同一の劣敗の程度と認められるものでも，生イカの場合の如く完全に流出することなく，その色素細胞は部分的に多少残つている。これは乾燥の初期において色素細胞が乾燥によつてある程度固定されるためであると考えられる。

Ⅲ イカ色素細胞の固定について

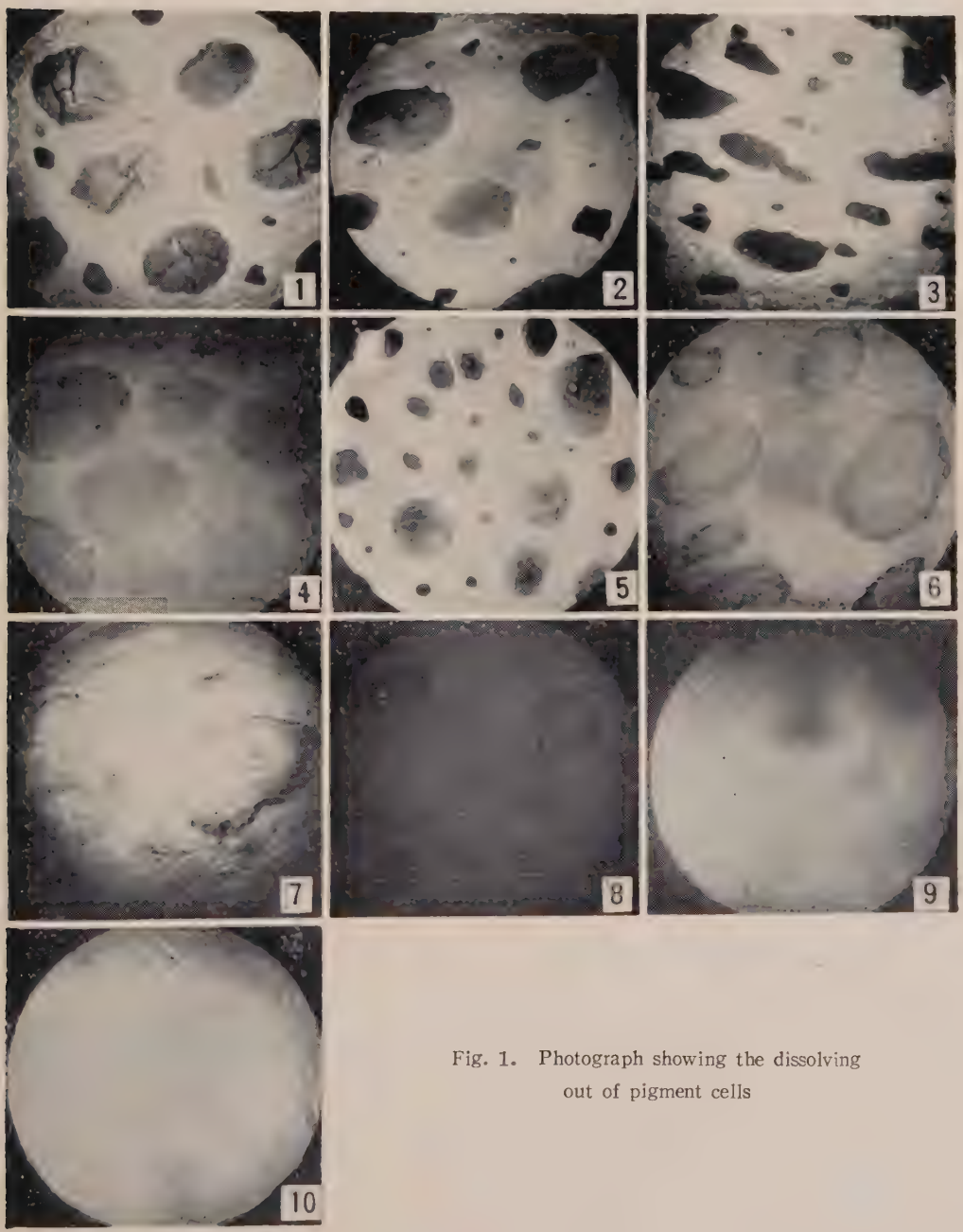


Fig. 1. Photograph showing the dissolving out of pigment cells

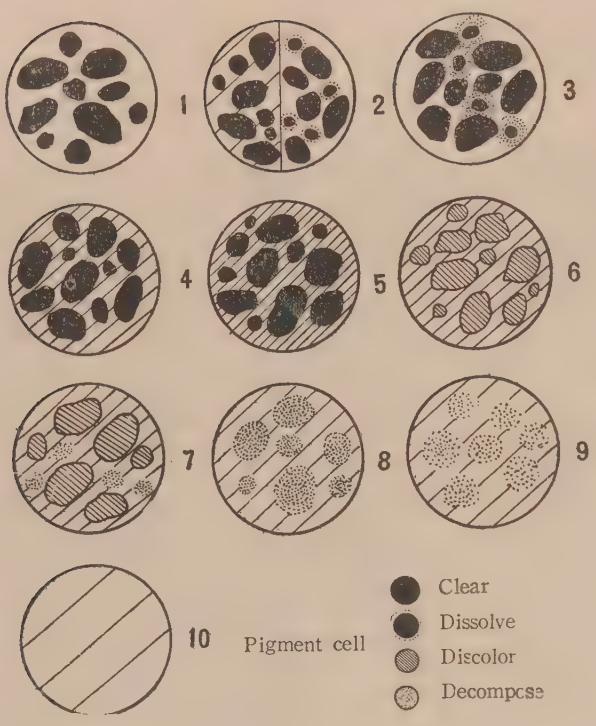


Fig. 2. Model chart divided into 10 grades of the dissolving out of pigment cells

等を以て色素の固定と崩壊防止の実験を行い，醋酸が最も良好であることを見，これに硫酸マグネシヤを添加し，雨イカ防止剤（特許72,308号）としている。こゝで著者等も更に多くの種類の酸類，塩類及びアルコール類，有機溶媒を使用し，色素細胞の固定並びに崩壊防止効果を実験した。

(1) 実験方法

先ず新鮮なスルメイカの胴の背部の正中線から離れて皮下色素細胞が孤立的に存在する部分から5～6 *cm* の肉片を皮付きのまま切り取つてそれらの部分を種々の濃度の薬品中に浸漬し，所定時間後とり出して色素細胞の状態を顕微鏡下（×40）で観察し，後1～2時間室温で乾燥し，後肉質が分解した場合を想定し，肉質をアルカリ性にするために0.05% NaOH溶液中に浸漬し，色素の溶出状態を時間的に観察した。その色素の溶出状況（第1図）を注意して観察した結果，次の第2図の模式図の如く10区劃に細別される。これを立木[4]又は谷川等[5]が色素細胞の変化状況から作つた標準と比較すると第6表（次頁）の如くである。

(2) 実験結果

各種薬品に浸漬し色素細胞を固定後，乾燥し後，アルカリ液に浸漬して固定した色素細胞の溶出状態を立木標準で記載すると第7～9表の如くである。

第7～9表に記載した実験結果よりみると，イカ表皮下の色素細胞の固定剤として醋酸を使用したものが最もよい結果を示している。このことは先に大島[2]が行つた実験結果を追証しているものと云えよう。2種以上の有機酸を用うる場合は醋酸とコハク酸又は酒石酸との混合液がよい結果を与えることが判つた。アルコール類としてはエチルアルコールを添加したものがよかつた。タンニン酸を有機酸に混合した溶液に浸漬する場合は効果がよいが，タンニン酸を使用した場合，スルメの肉質を硬くすることがあるので更にこの点については検討を要する。

Ⅳ 各種色素細胞固定剤に浸漬後高濕度において灌水せずにムレさせた場合の色素溶出状況

(1) 実験法

前項において色素細胞を固定するのに効果があると思われた次の固定剤にイカを1時間浸漬し，後 R. H. 90～95%，温度20°～25°C の環境に放置して灌水せずにムレさせた場合の色素の溶出状態を比較した。固定剤としては（1）水（対照），（2）醋酸5%溶液，（3）醋酸3%溶液と酒石酸2%溶液の混合液，（4）醋酸3%溶液とコハク酸2%溶液との混合液，（5）醋酸5%溶液とクエン酸ソーダ3%溶液との混合液，（6）醋酸5%とタンニン酸0.5%溶液との混合物，（7）醋酸5%溶液，タンニン酸0.5%溶液，エチルアルコール5%溶液との混合液，（8）酒石酸3%溶液とクエン酸2%溶液との混合液等を用いた。

(2) 実験結果

水（対照）に浸漬したものでは1昼夜で色素を溶出し，表皮に接する肉部も淡青色に着色した。他の固定

Table 6. The comparison of dissolving of pigment cells in this experiment with Tachiki's grade of the change of pigment cells

Change of pigment cells in this experiment	No. 1	No. 2	Nos. 3,4	Nos. 5,6	Nos. 7,8	Nos. 9,10
Tachiki's grade	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)

Table 7. Changes of pigment cells fixed with mixed solution of organic acids and NaCl, Ethyl alcohol

Kinds of fixing solution of pigment cells ＼ Time immersed in 0.05% NaOH solution	Tachiki's grade	
	1 *hr.*	3 *hrs.*
Acetic acid 5%	(B)	(D)
Acetic acid 5% + Oxalic acid 2%	(C)	(D)
Acetic acid 3% + Formic acid 2%	(B)	(E)
Acetic acid 3% + Citric acid 2%	(A)	(D)
Acetic acid 3% + Succinic acid 2%	(A)	(C)
Acetic acid 3% + Tartaric acid 2%	(A)	(C)
Acetic acid 3% + Boric acid 2%	(A)	(D)
Acetic acid 5% + NaCl 2%	(B)	(D)
Citric acid 5% + 〃	(A)	(F)
Tartaric acid 5% + 〃	(A)	(F)
Boric acid 5% + 〃	(C)	(E)
Boric acid 5%	(C)	(E)
Tartaric acid 5%	(A)	(E)
Tannic acid 5%	(D)	(D)
Tannic acid 0.5%	(D)	(F)
Tannic acid 0.1%	(D)	(F)
Tannic acid 0.5% + Ethyl alcohol 5%	(E)	(F)
Succinic acid 3% + Citric acid 2%	(A)	(C)
Tartaric acid 3% + 〃	(A)	(A)
Tartaric acid 3% + Succinic acid 2%	(A)	(C)

剤に浸漬したものはタンニン酸を混合したものを除いた全部のものが2昼夜後にはかなりの色素の溶出をみた。タンニン酸を含むものは3昼夜後で表皮がやや軟化するが，色素の溶出状態は他の固定剤に浸漬したものより少く，良好な結果を得た。

以上の結果からタンニン酸を有機酸と混合使用することは色素溶出防止の点からみれば良いということが判つた。併し雨イカの他の現象を防止し得るか否かについては次項に述べたい。

V 各種色素固定剤でイカ色素を固定後灌水中においた場合の変化

(1) 実験法

前項においてタンニンを使用した場合，イカの表皮下の色素細胞を固定するのに良好な結果が得られたのでこゝではイカを各種固定剤（タンニン酸液，大島式雨イカ防止剤）又は防腐剤（フラスキン，デハイドロ醋酸）の溶液中に浸漬し，これを前報の恒温恒湿装置内で灌水の出来る装置[1]中に吊下し，温度24°C ±2°C, R.H. 85～90% で灌水させながら放置してその雨イカ状態をV.B.-N量，pH，色素細胞及び外観状態から観察した。

(2) 実験結果

実験結果は第10表乃至第15表に示す如くである。

第10表はタンニンの0.5%溶

Table 8. Changes of pigment cells fixed with mixed solutions of organic acids and ethyl alcohol

Kinds of fixing solution of pigment cells \ Time immersed in 0.05% NaOH solution	Tachiki's grade	
	1 *hr.*	3 *hrs.*
Acetic acid 5% + Tannic acid 0.5%	(A)	(A)
Succinic acid 5% + 〃	(A)	(A)
Citric acid 5% + 〃	(A)	(A)
Tartaric acid 5% + 〃	(A)	(A)
Acetic acid 5% + Tannic acid 0.5% + EtOH 10%	(A)	(A)
Succinic acid 5% + Tannic acid 0.5% + EtOH 10%	(A)	(A)
Citric acid 5% + Tannic acid 0.5% + EtOH 10%	(A)	(A)
Tartaric acid 5% + Tannic acid 0.5% + EtOH 10%	(A)	(A)

Table 9. Change of pigment cells fixed with mixed solutions of organic acids and Na salts and NaCl

Kinds of fixing solution of pigment cells \ Time immersed in 0.05% NaOH solution	Tachiki's grade	
	1 *hr.*	3 *hrs.*
Acetic acid 5% + Tannic acid 0.5% + NaCl 3%	(A)	(B)
Citric acid 5% + Tannic acid 0.5% + NaCl 3%	(A)	(B)
Tartaric acid 5% + Tannic acid 0.5% + NaCl 3%	(A)	(B)
Succinic acid 5% + Tannic acid 0.5% + NaCl 3%	(B)	(B)
Acetic acid 5% + Na-citrate 3%	(B)	(C)
Citric acid 5% + Na-acetate 3%	(C)	(D)
Tartaric acid 5% + Na-citrate 3%	(A)	(B)
〃 + Na-acetate 3%	(A)	(B)
Succinic acid 5% + Na-acetate 3%	(A)	(D)
〃 + Na-citrate 3%	(A)	(E)
Acetic acid 5% + Na-phosphate 3%	(A)	(D)
Citric acid 5% + Tannic acid 0.1%	(B)	(C)

液に浸漬後灌水中に放置した場合で，この表で明らかな如く灌水時間の経過と共に，イカは吸水し，その重量を増加し，灌水後48時間頃で最大となり，その後はやや減少している。V.B.-N量の変化は灌水中の放置時間の経過と共に漸減している。これは灌水にあたつて生成したV.B.-Nが流出したゝめであろうと考えられる。然し76時間（3日目）頃より附着していた細菌の増殖が盛んとなるため蛋白の分解も劇しく，V.B.-N量は増加し始め，この時期ではpHは6.0以上となり，色素も溶出し，肉質の軟化及び臭気の発生量より雨イカの現象がはつきりと認められた。そしてこのように雨イカの様相を呈したイカを乾燥すれば肉質が硬くなる。

次に大島式雨イカ防止剤の溶液に浸漬後，灌水中に放置した場合の実験結果を示す第11表よりみるに，イカの重量は前表と同じように灌水の始めは急激に増加し，72時間後に恒量となりV.B.-N量は一旦急激に増加し，その後は次第に減少し，放置後58時間目に最少となり，72時間以後ではpH6.0以上となつた。官能検査結果も48時間以後になつて漸くやや異臭を感じ始め，色素も流出し始めている。58時間目には判然と異臭が出ている。72時間目には腐敗臭も著しく，色素も著しく溶出してイカ肉は赤変している。なお之等のイカ肉を乾燥したスルメはタンニン酸溶液で処理したものよりよい結果を得たが，それにして

Table 10. After immersing squid in 0.5% tannic acid solution, the squid has left in falling water

Leaving time (*hr.*)	Weight of squid (*g*)	Temp. (°C)	R. H. (%)	V.B.-N (*mg%*)	pH	Tachiki's grade*	Appearance
0	194	24	85	9.8	5.5	(A)	Fresh
24	232	24.5	85～90	10.0	5.5	(A)～(B)	No smell, meat hardened, color of the body became grey. Skin was thick.
48	237	24	85	6.1	5.6	(C)	No smell, meat hardened, color of the body became muddy grey. Skining was easy.
72	230	24.5	85	14.7	5.9	(D)～(E)	Meat hardened, slight smell
76	230	24.5	85	32.7	5.8	(E)～(F)	Putrefactive smell

* Condition of pigment cells

Table 11. After immersing squid in the mixed solution of acetic acid and $MgSO_4$, the squid has left in falling water

Leaving time (*hr.*)	Weight of squid (*g*)	Temp. (°C)	R. H. (%)	V.B.-N (*mg%*)	pH	Tachiki's grade	Appearance
0	191	23	90	10.0	5.4	(A)～(B)	Fresh
24	234	25	80～85	12.0	5.4	(C)～(D)	Meat was soft, no smell, like raw meat. Pigment cells began to dissolve. Surface reddened somewhat.
48	238	25	80～85	6.0	5.7	(E)	Meat was soft, somewhat smelly. Pigment cells began to dissolve.
60	238	25	85	4.1	5.7	(F)	Putrefactive smell. Pigment cells dissolved out.
72	238	25	80～85	8.7	6.0	(F)	Putrefactive smell. Pigment cells dissolved out.

も雨イカとして状態は顕著に現われている。

以上の結果より大島式雨イカ防止剤によつて処理した場合と0.5% タンニン酸で処理した場合とを比較するに，タンニン酸処理のものは72～76時間後に V.B.-N 量は急増し，色素もやや溶出し，官能試験によつても腐敗が認められるのに対し，大島式雨イカ防止剤を使用した場合は60時間目頃より V.B.-N 量は急増し，腐敗臭を発生し，色素の流出が始まり，特に72時間目以後では色素の溶出程度は甚だしくなつている。而して之等の薬品で処理したものも雨イカの様相を呈した後に乾燥すれば肉質が硬くなつている。又吸水量にも差異があり，大島式雨イカ防止剤で処理した場合は始めのイカ重量に対し21.6%吸水したのに対し，タンニン酸で処理したものは25.6%である。之等吸水量の差異はイカ肉表面の蛋白変性の程度に差異があるためと

思われる。なお大島式雨イカ防止剤には醋酸を使用しているが，放置初期ではイカ肉表面の蛋白を変性させ幾分防腐効果も認められ，色素の固定も前項試験と同様に効果はあるが，タンニン酸処理に比ぶれば色素の固定はやや劣るようである。又灌水によつて醋酸の流失があり，従つて灌水中では約48時間放置すれば雨イカ防止効果はうすれてゆくようである。

次に，先に五十嵐等[6]又は岩手県水産試験場[7]によつてフラスキンによる雨イカの防止法の実験が行われたが，岩手県水試の実験においてはフラスキンに醋酸を添加したものが（フラスキン0.05gを0.25%醋酸液に添加）腐敗防止に有効であることを認めている。著者等もフラスキンを使用した場合，その処理後灌水した時のイカの色素状態を比較するために行つた実験結果は第12表及び第13表の如くである。

第12表は0.5% フラスキン溶液で，第13表は1%フラスキン溶液で処理した場合を示すもので，これらの表をみて明らかなように，0.5%又は1%フラスキン溶液に5分間浸漬したイカ肉は48時間までは何等色素細胞にも変化なく，又臭気も出ていないし，pH6.6である。併し72時間目には色素細胞も溶出し始め，腐敗臭が出はじめており，pHもアルカリ性側になつている。フラスキンの1%と0.5%の濃度の差では雨イカ防止の効果の点では大差はない。即ち我々が期待したほど大きい効果は認められなかつた。

最後に乾燥食品に対して防腐効果大であると云われているデハイドロ醋酸（D.H.A）の1%及び2%溶液に5分間浸漬し，灌水中に放置した時の結果は第14表の如くである。

第14表はD.H.A. 1%溶液に，第15表は同2%溶液に5分間浸漬した場合を示すもので，それらの表より明らかなように，D.H.A. も48時間までは変化なく，色素細胞の状態は72時間目より変化しており，pH も6.5～6.6となり，漸く雨イカの様相を示し始めている。これはD.H.A. が微酸性を呈するため色素細胞の崩壊流失を幾分阻止するためと思われる。

Table 12. After immersing squid in 0.5% fraskin (nitrofrazon) solution, t¹ e squid has left in falling water

Leaving time (*hr.*)	Weight of squid (*g*)	Temp. (°C)	R. H. (%)	V.B.-N (*mg%*)	pH	Bacterial count	Tachiki's grade	Appearance
0	145	25	80～85	14.0	6.0	71×10^3	(A)	Fresh
24	153	〃	〃	9.5	6.1	39×10^3	(A)～(B)	Meat somewhat softened. Almost like fresh raw squid. Surface somewhat reddened.
48	149	〃	〃	6.0	6.6	12×10^4	(B)～(C)	Somewhat abnormal smell. Surface almost unchanged.
72	154	〃	〃	4.3	7.1	82×10^5	(D)	Putrefactive smell began to grow. Surface almost unchanged.
96	154	〃	〃	7.0	7.3	——	(E)	Meat softened, surface reddened. Putrefactive smell dominant
120	157	〃	〃	24.3	7.5	50×10^6	(F)	Putrefactive smell was strong. Surface was enveloped by slime. Small spots generated on the surface.

Table 13. After immersing squid in 1% fraskin (nitrofrazon) solution, the squid has left in falling water

Leaving time (*hr.*)	Weight of squid (*g*)	Temp. (°C)	R. H. (%)	V.B.-N (*mg%*)	pH	Bacterial count	Tachiki's grade	Appearance
0	119	25	80～85	10.9	6.0	——	(A)	Fresh
24	119	〃	〃	7.2	6.4	14×10^3	(A)～(B)	Meat swollen, but almost like fresh raw squid. Surface colored partly in yellow by fraskin.
48	119	〃	〃	3.9	6.6	53×10^3	(C)	Meat swollen, surface reddened.
72	120	〃	〃	2.8	7.3	32×10^5	(D)～(E)	Abnormal smell began to grow. Meat swollen and softened. Surface reddened
96	121	〃	〃	2.8	7.4	——	(E)	Meat was almost unchanged. Putrefactive smell began to grow.
120	125	〃	〃	24.7	7.7	30×10^6	(F)	Putrefactive smell dominant. Surface reddened. Meat partly colored orange.

Table 14. After immersing squid in 1% D. H. A. solution, the squid has left in falling water

Leaving time (*hr.*)	Weight of squid (*g*)	Temp. (°C)	R. H. (%)	V.B.-N (*mg%*)	pH	Bacterial count	Tachiki's grade	Appearance
0	132	25	80～85	11.3	5.9	32×10^3	(A)	Fresh
24	136	25	〃	7.7	6.0	60×10^3	(B)	Meat somewhat swollen, surface reddened.
48	135	〃	〃	3.3	6.1	11×10^4	(B)～(C)	Meat unchanged.Surface reddened.
72	140	〃	〃	4.4	6.5	38×10^6	(D)～(E)	Smell other than fresh fish smell began to grow. Pigment cells fell away. surface reddened.
96	137	〃	〃	29.1	7.1	——	(F)	Putrefactive smell was strong. Surface somewhat dissolved. Skining was difficult. Pigment cells completely dissolved out.

Table 15. After immersing squid in 2% D. H. A. solution, the squid has left in falling water

Leaving time (*hr.*)	Weight of squid (*g*)	Temp. (°C)	V.B.-N (*mg%*)	pH	Bacterial count	Tachiki's grade	R. H. (%)	Appearance
0	142	25	11.3	6.2	80×10^2	(A)	80～85	Fresh
24	147	〃	8.1	6.3	50×10^2	(B)	〃	Meat and odour were like fresh raw squid. Color of the surface faded. Not reddened.
48	145	〃	3.1	6.2	59×10^3	(D)	〃	Meat and odour were like fresh raw squid. Color of the surface somewhat reddened.
72	148	〃	4.8	6.6	13×10^5	(E)	〃	Meat swollen, elasticity decreased. Somewhat smelly
96	152	〃	27.1	7.2	——	(F)	〃	Meat swollen, no elasticity. Complete putrefactive smell. Pigment cells dissolved out.

以上のように色素固定剤又は防腐剤の溶液にイカを短時間浸漬し，後灌水中に放置した時は何れも48時間（2昼夜）後は雨イカの状態となることを防止することが出来るが，これらの中でも D.H.A. の効果が大であつて，72時間（3昼夜）後になつて始めて雨イカの状態となる。

VI 各種防腐剤に浸漬後ポリエチレン・カバーて蔽つて灌水中に放置した場合のイカの変化

前項において灌水によりイカ肉中の可溶性蛋白の流出が考えられるので，前項で最も効果の大であると考えられた D.H.A. 溶液にイカ肉を浸漬後，ポリエチレン・カバーをかけて前項同様の装置内で灌水しながらイカ肉より可溶性成分の流失を防止し得るや否やを検討した。なおこゝで界面活性剤の食用に許可されたスパン-20（Sorbitan monolaurate）の単用及び併用をも行つたものについてもポリエチレン・カバーをかけて検討した。

(1) 実 験 法

先ず前項と同様に処理したイカ肉にポリエチレン（$20\times20\times25cm$）をかけ，これを前項に用いた恒温恒湿装置中（温度24°C, R.H. 85～90%）で灌水（17°Cの水を60～100$mm/cm^2\cdot hr.$）させ，一定時間毎にイカ肉重量，V.B.-N量，pH，色素細胞の変化をみた。又次にスパン-20の1%，0.5%，0.2%溶液に浸漬したものを同じくポリエチレン・カバーをかけて灌水中におき，前記と同じく観察し，更に又1%及び2% D.H.A. 溶液に浸漬したものスパン-20溶液を噴霧した後灌水中に放置し，同じく観察した。

(2) 実験結果

生イカを調理後無処理のままポリエチレン・カバーをかけ灌水中に放置した場合の実験結果は第16表の如くである。

第16表にみられるように，イカ肉を薬品に浸漬せず無処理のままポリエチレン・カバーで被覆した場合は前項の結果とは異なり，V.B.-N量は放置初期段階においても減少せず，又pH値も上昇せず，放置時間が経つに従つて増加し，放置後48時間で色素は溶出し，腐敗臭を発生し，色素細胞は溶出し，肉色は赤色となり，明らかにムレイカの状態になつた。この結果からポリエチレン・カバーを用いたのみでも灌水による

Table 16. Squid covered with polyethylene sheet has left in falling water

Leaving time (*hr.*)	Weight of squid (*g*)	Temp. (°C)	R. H. (%)	V.B.-N (*mg%*)	pH	Bacterial count	Tachiki's grade	Appearance
0	122	24	85	8.7	5.3	——	(A)	Fresh
24	124	24	90	19.1	5.4	——	(A)～(B)	Meat softened, surface somewhat faded. No smell
48	124	24	85～90	35.4	5.7	——	(D)～(E)	Meat very softened. Putrefactive smell began to grow.
72	124	24	85～90	107,7	6.1	——	(F)	Putrefactive smell was remarkable. Skining was difficult. Pigment cells were dissolved out.

イカ肉からの可溶性蛋白の流失は防止され，雨イカ特有の肉擦せの現象は認められなくなるが，イカ肉の腐敗を防止することは出来ない。

次に第17表乃至第18表は界面活性剤のスパン-20を1%，0.5%，0.2%の水溶液とし，これらの溶液200ccに夫々イカを5分間宛浸漬し，ポリエチレレン・カバーをかけて灌水中に放置した時のイカ肉質の変化をみたものである。

第17表乃至第18表にみられるようにスパン溶液の防腐効果はその溶液の濃度によつて著しく影響され，1%及び0.5%の濃度ではV.B.-N量の増加，細菌数，外観の変化等において著しい差異は認められず，共に防腐性を有することが判るが，0.2%溶液では著しい防腐作用がなかつた。従つてイカ肉にスパンを使用する場合は0.5%溶液とするのが適当である。

前述のように雨イカの発生においては肉質のV.B.-N量が30*mg%*以上となり，pHが6.0以上となれば色素は溶出し始めるが，スパン-20により処理したイカ肉はこのような状態になつても その色素細胞は固定されている。それ故スパンには上記のような防腐性の他に色素固定剤としての効果もあるように思われる。尙イ

Table 17. After immersing squid in 1% span solution, the squid covered with polyethylene sheet has left in falling water

Leaving time (*hr.*)	Weight of squid (*g*)	Temp. (°C)	R. H. (%)	V.B.-N (*mg%*)	pH	Bacterial count	Tachiki's grade	Appearance
0	120	25	80～85	10.0	6.1	28×10^3	(A)	Very fresh. Meat elastic
24	124	〃	〃	16.0	5.9	29×10^3	(A)～(B)	Meat softened, surface somewhat reddened. Slightly smell
48	114	〃	〃	18.3	5.2	70×10^3	(C)	Meat and surface appeared glossy, meat softened. Almost no pigment cells were dissloved.
72	112	〃	〃	37.2	5.5	14×10^4	(D)～(E)	Surface of the meat was enveloped by slime, and reddened. Putrefactive smell

Table 18. After immersing squid in 0.5% span solution, the squid covered with polyethylene sheet has left in falling water

Leaving time (*hr.*)	Weight of squid (*g*)	Temp. (°C)	R. H. (%)	V.B.-N (*mg%*)	pH	Bacterial count	Tachiki's grade	Appearance
0	126	25	80～85	6.0	5.3	10×10^3	(A)～(B)	Fresh
24	120	〃	〃	14.0	5.3	28×10^3	(B)～(C)	Meat softened, no smell, surface reddened, pigment cells somewhat dissolved out.
48	116	〃	〃	14.0	5.3	14×10^4	(D)	Meat softened, abnormal odour which was not putrefactive smell began to appear. Condition of the surface was like that of 24hrs old sample.
72	113	〃	〃	30.0	5.9	——	(E)	Complete putrefactive smell. Surface reddened, and was enveloped by slime.

Table 19. After immersing squid in 0.2% span solution, the squid covered with polyethylene sheet has left in falling water

Leaving time (*hr.*)	Weight of squid (*g*)	Temp. (°C)	R. H. (%)	V.B.-N (*mg%*)	pH	Bacterial count	Tachiki's grade	Appearance
0	240	25	80～85	11.4	5.3	22×10^3	(A)	Fresh
24	235	〃	〃	12.7	5.2	48×10^3	(B)	Meat very much softened. Surface reddened, raw fish smell
48	130	〃	〃	17.7	5.2	17×10^4	(C)	Meat softened. Surface reddened. Abnormal smell began to grow.
72	129	〃	〃	49.7	5.8	21×10^5	(D)	Surface was slimy, glossy, reddened. Putrefactive smell remarkable

カ肉に対して界面活性剤を使用した例としては高橋[8]の「水戻りし易いスルメ」製造の際における使用例はあるが，従来雨イカ防止法には使用されていなかつた。

上記の如くスパン-20は色素細胞固定作用と共に若干の防腐作用を有することが判つたので，前項で雨イカ防腐剤としての効果が認められたD.H.A.とスパン-20を併用することにより色素細胞の固定及び防腐効果を一層促進せしめるため2%及び1%のD.H.A.溶液にイカを浸漬した後スパン-20の1%溶液を噴霧し，ポリエチレン・カバーを用い，これに灌水しながらイカの変化をみた結果は第20表及び第21表に示す如くである。

Table 20. After immersing squid in 1% D. H. A. solution, the squid was sprayed by 1% span solution, and covered with polyethylene sheet and then has left in falling water

Leaving time (*hr.*)	Weight of squid (*g*)	Temp. (°C)	R. H. (%)	V.B.-N (*mg%*)	pH	Bacterial count	Tachiki's grade	Appearance
0	112	25	80～85	12.7	6.1	30×10^2	(A)～(B)	Fresh
24	〃	〃	〃	14.7	6.3	47×10^3	(B)	Meat somewhat swollen. Surface partly reddened, fresh raw fish smell. The color of surface was good.
48	114	〃	〃	13.0	6.5	42×10^3	(C)	Meat somewhat swollen. Surface partly reddened. The color of surface was good.
72	119	〃	〃	12.0	7.1	20×10^4	(C)～(D)	Meat elastic. The color of surface was good.
96	118	〃	〃	12.0	7.1	20×10^4	(E)	Meat softened, putrefactive smell began to grow. Almost no pigment cells dissolved.
120	——	〃	〃	13.1	7.5	10×10^5	(E)～(F)	Complete putrefactive smell. Surface was enveloped by slime.

Table 21. After immersing squid in 2% D. H. A. solution, the squid was sprayed by 1% span solution, and covered with polyethylene sheet and then has left

Leaving time (*hr.*)	Weight of squid (*g*)	Temp. (°C)	R. H. (%)	V.B.-N (*mg%*)	pH	Bacterial count	Tachiki's grade	Appearance
0	114	25	80～85	12.9	6.1	40×10^3	(A)	Fresh
24	121	〃	〃	7.3	6.2	18×10^3	(B)	Meat swollen and softened. Surface somewhat reddened. Fresh raw fish odour
48	117	〃	〃	10.9	6.4	44×10^3	(B)	Meat swollen. It was like fresh squid. Surface somewhat reddened.
72	124	〃	〃	14.4	6.6	74×10^3	(C)	Meat swollen, and became somewhat hard. Surface somewhat reddened. No putrefactive smell
96	124	〃	〃	13.1	7.0	10×10^4	(D)	Meat softened. Somewhat putrefactive smell. Surface reddened increasingly.
120	115	〃	〃	26.6	7.5	13×10^5	(E)	Surface was enveloped by slime. Complete putrefactive smell

第20表及び第21表ではイカ肉重量の変化は D.H.A. の濃度とは無関係に一定の値を示しているが，これはイカの表面を被覆したスパンの濃度が同一であつたためと考えられる。又イカ肉の pH 値及び V.B.-N 量は灌水放置後72時間経過してから急激に増加しているので今までの実験結果と併せ考えて，この D.H.A. とスパンの併用では72時間までイカ肉の品質は変化なく維持されると云えよう。細菌数の変化は2% D.H.A. 溶液で処理した場合は一旦減少し，1% D.H.A. 溶液で処理した場合は減少することなく増加の傾向を示した。それ故2% D.H.A. 溶液に浸漬した場合の殺菌力は1% D.H.A. の場合に比し，一応勝つているとも考えられるが，放置時間が長くなれば濃度の差による変化は認められず，更に肉質，色素の溶出程度からみれば，1% D.H.A. 溶液で処理した時に好結果を得ている。又 D.H.A. 溶液処理及びスパン溶液処理を併用し，ポリエチレン・カバーを利用した時は「雨イカ」となる時間は放置後96時間目であるので，無処理のイカ肉が30時間程度で「雨イカ」となるに対し，著しく効果のあることが判る。

以上の結果よりイカ肉を1～2% D.H.A. 溶液に5分間浸漬した後0.5% スパン溶液を噴霧し，ポリエチレン・カバーで被覆すれば灌水の温度17°C, R.H. 90%，灌水時間96時間の状況下に放置しても「雨イカ」又は「ムレイカ」とならず，これを晴天下に乾燥すれば肉質は幾分硬化しているが，肉痩せなく，色素細胞は固定されている。即ち以上の如く実験室内における実験では確かに D.H.A. 溶液とスパン溶液の併用処理によりイカ肉の変敗を防止し得，ポリエチレン・カバーにより肉痩せを防ぐことが出来るここが明らかになつた。更にこれを実地に試験した結果良好な結果を得ている。

Ⅶ 界面活性剤でイカ肉を処理した時の乾燥速度について

前項において防腐剤（D.H.A.）と界面活性剤スパンを併用すれば雨イカ防止に対し著効のあることを認めたが，この場合スパンでイカ肉表面を被覆すればそのイカ肉の乾燥速度が遅れることが予想される。そこで果して遅れるものかどうかを知るためにスパン-20 溶液で処理したイカを R.H. 8.0%，25°C の装置内で乾燥し，その重量変化より魚体の乾燥速度の差異をみた。その実験結果は第22表の如くである。

Table 22. Change in the weight (g) and the drying ratio (γ) of squid which was immersed in various concentrations of span solutions

Time of drying (hr) \ Conc. of span (%)	1.0		0.5		0.2		0.0	
	g	γ	g	γ	g	γ	g	γ
0	9.2	1.00	8.9	1.00	9.8	1.00	10.5	1.00
24	7.7	0.89	7.7	0.86	8.9	0.91	9.5	0.90
48	5.2	0.56	5.6	0.57	6.7	0.68	7.0	0.67
72	3.9	0.42	4.2	0.47	5.2	0.53	5.5	0.57
96	2.9	0.32	3.2	0.36	3.9	0.40	4.2	0.40
120	2.2	0.24	2.4	0.27	2.7	0.28	2.9	0.28
178	2.1	0.23	2.1	0.24	2.4	0.25	2.6	0.25

第22表にみられるように乾燥のごく初期（24時間後）ではスパン濃度の小なるもの程，乾燥は速いが，24時間以後では予期に反し乾燥速度はスパン濃度の大なる程やや速くなつている。

今参考のために第22表の実験結果を乾燥歩留（γ）と乾燥時間（t）との関係を表わす(1)式に代入すれば第3図の如くになる。

$$\gamma = \frac{W}{W_0} = e^{-\lambda t} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots (1)$$

(1) 式において W は乾燥過程中のイカの重量，W_0 は乾燥前のイカ重量，これから乾燥率 λ を求めると第23表の如くになる。

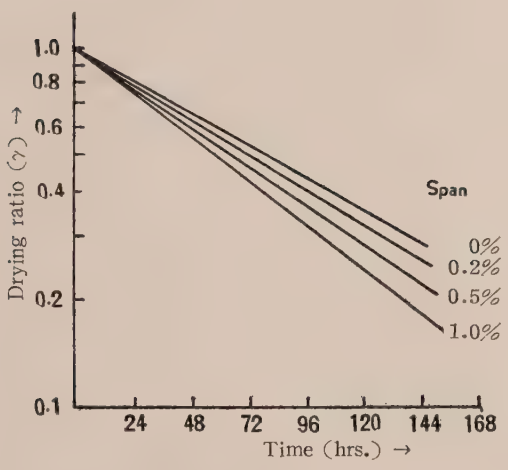


Fig. 3. Change in the drying ratio(γ) during the course of drying of squid after immersed in various concentrations of span solution

前述の如くイカ肉をスパン溶液に浸漬した場合，その乾燥率は予期に反しやゝ増加するが，これはスパンのもつ極性基がイカ肉蛋白と結合して肉組織内部の水の移行が容易になつたためとも想像され，又乾燥初期即ち放置後24時間以内ではスパンのイカ肉に対する附着原理が所謂境界面被覆を形成し，イカ肉表面に附着した水分の蒸発が阻害されたためと想像される。

何れにしても界面活性剤スパンを使用することによつてイカ肉の乾燥が遅れないということが明らかになつたため，スパンを利用することは「雨イカ」の防止法として有効と考えられる。

Table 23. Change in the drying ratio (λ) of squid after immersed in various concentrations of span solution

Conc. of span (%)	1.0	0.5	0.2	0.0
λ	0.00222	0.00218	0.00166	0.00165

要　　約

イカの乾燥中，雨天に逢つて出来上つたスルメの表面が赤色となり一種の光沢をもち肉が痩せて薄く又脚部は黒褐色となり，その吸盤が殆んど失われているようなものを雨イカと呼んでいる。その原因は雨天に逢つた乾燥中のイカはその環境の湿度が既に高く，イカ肉質の分解速かで腐臭を生じ肉質のpHも4.5から6.5位にまでなり，又更にアルカリ性となるため皮下の色素細胞内の色素が流出し，肉面は赤味を帯びるに至る。又雨水にあたるため魚肉蛋白中可溶性のものは溶解し肉の厚さは段々と薄くなる。従つて肉繊維のみが残るようになり，これを乾燥しても肉の薄いスルメとなり縦にも裂け易くなる。斯様な雨イカの発生を防止するため大島は醋酸と硫酸マグネシウムを以て色素細胞を固定し，その赤変を防がんとしたが長時間雨にあたると醋酸は流失し効果が薄くなる。こゝで著者等は色素固定，肉の防腐可溶性蛋白の流去防止等について実験し，その結果色素を固定し且つ肉の防腐のためには醋酸と D.H.A. が良いことをみ，又 D.H.A. が長い雨により流去するのを防ぐため界面活性剤（スパン）を以て被覆した。更に可溶性蛋白の流去防止にはポリエチレン・カバーの蔽いをした。斯様な方法によると雨イカとなることを防止出来ることを実験室内での灌水及び実地にイカを雨にあてゝ実験し良結果を得た。

本研究は水産庁による農林漁業研究補助金により遂行した。こゝに深甚の謝意を表する次第である。

文　　献

1) 谷川・秋場・沼倉（1954）. 北大水産彙報 4(4), 323-326.
2) 大島・里館（1937）. 水産学雑誌（41), 36.
3) 谷川・長沢・竹内・杉山（1956）. 北大水産彙報 7(2), 172-184.
4) 立木（1951）. 水検月報（31), 4.
5) 谷川・元広・富田（1956）. 北大水産彙報 7(2), 165-171.
6) 五十嵐・武田（1955）. イカ蛋白研究班報告（3), 76-80.
7) 本橋・上林・湊・佐藤（1953）. 干スルメ防腐試験報告（製造パンフレット第6号),22p. 岩手県水産試験場.
8) 高橋・竹井（1955）. イカ蛋白研究班報告（3), 80-81.

STUDIES ON THE REPRODUCTIVE ORGANS OF RED ALGAE

II. On *Erythrophyllum Gmelini* (GRUN.) YENDO

Jun TOKIDA and Tomitarô MASAKI
Faculty of Fisheries, Hokkaido University

The red alga, which has hitherto been known under the name of *Erythrophyllum Gmelini* since Yendo (1915) identified it with *Kallymenia Gmelini* Grunow (1870) and proposed to transfer the species to Erythrophyllum, is distributed widely in the Kurile Islands (Nagai, 1941, p. 174-5) and in the eastern districts of Hokkaido ranging from Kushiro to Nemuro (Okamura, 1921, p. 94). It was also reported from Agattu Island, Alaska, by Setchell and Gardner (1903, p. 307) and Atka Island, Aleutian Islands, by Okamura (1933, p. 89).

The external and internal structures of the vegetative thallus of the alga were thoroughly described and illustrated by Yendo (1915) and Okamura (1921, pl. 172). On the other hand, its reproductive organs have been unknown to the previous authors such as Yendo (l. c.) and Nagai (l. c.) and quite imperfectly known from only the brief remarks on the cystocarp given by Setchell and Gardner (1903, p. 308) and Okamura (1933, p. 89).

The mature cystocarpic specimens of this alga were collected by the junior writer on March 27, 1945, for the first time, and secondly on March 12, 1949, at Shireto Point in the outskirts of Kushiro City, Hokkaido. A provisional report on the writers' observations of the cystocarp was presented in September 1949 and in November of the same year before the Hokkaido regional conference of the Japanese Society of Scientific Fisheries held in Hakodate and that of the Botanical Society of Japan held in Sapporo respectively.

With the object of obtaining more materials of the female plant and also, if possible, male and tetrasporic specimens, collections of the alga were repeated at the same place in other months, *i. e.*, in April, May, October and November. The writers were fortunately successful in collecting the immature tetrasporic individuals for the first time in late November 1955. Being encouraged by this discovery, the writers asked Mr. Shigeru Sasaki of the Kushiro Branch of the Hokkaido Fisheries Experimental Station to collect the plant at Shireto Point in January and February. Mr. Sasaki's collections made in the middle of January and in early February 1956 contained, just according to expectation, a large number of mature tetrasporic specimens and several young cystocarpic ones. In the course of the present study the writers came across a few specimens

Fig. 1. Cross section of the upper segment of a frond. *gc*, giant cell × 275
Fig. 2. Vertical section of the upper segment of a frond. *gc*, giant cell × 275
Fig. 3. Cross section of the lower stem-like portion of a frond. *gc*, giant cell × 275
Fig. 4. Vertical section of the lower stem-like portion of a frond × 275

of the present alga collected by Mr. T. Inaba at Akkeshi, Prov. Kushiro, on June 16, 1938, and found that one of them was bearing mature cystocarps. Thanks to these fertile materials it is now possible to discuss the systematic position of the plant with certainty. Here the writers wish to acknowledge their indebtedness to Mr. S. Sasaki for his valuable assistance. The writers' sincere thanks are also due to Mr. M. Sakurai, director of the above mentioned Branch, who afforded the writers many facilities for the present study, and to Mr. T. Inaba for his nicely preserved specimens presented kindly to the senior writer.

The female plant collected in November can be distinguished from the sterile or tetrasporic individuals by its possession of faintly dark brown colored strands along the longitudinal axis of the upper segments of the frond. Sections through these strands reveal here and there the presence of the procarps of a characteristic structure. Later on these strands become more dark in color as may be seen in the specimens collected in January and February. Carpospores are already produced in those specimens, but they are not yet so fully matured as to form cystocarps. The cystocarps are observed in the specimens collected in March 1945 and 1949 as mentioned above, in the form of small elliptical rings, in surface view, elongated in the direction of the frond axis, and scattered separately or in irregular confluent groups in the upper segments of the frond. The cystocarps themselves do not push up the frond surface, but the frond portion that contains cystocarps is slightly thickened as a whole. Such a ringlet-shaped cystocarp has not been described in any other known species of Florideae, so far as the writers have been able to find. The new generic name, Cirrulicarpus, proposed in this paper for the present alga, is based on this characteristic appearance of the cystocarp.

The structure of the procarp, the development of the gonimoblast, and the character of the tetrasporangia in the present alga are described as follows. The male reproductive organ is not observed yet.

The carpogonial branch consists of six cells arranged in a strong curve. The basal cell, which is the largest and more or less irregular in shape, is situated so closely beneath the carpogone that the writers are strongly inclined to interpret it as the auxiliary cell though they have not been successful in observing the actual fusion between it and the carpogone.

After fertilization, all cells of the carpogonial branch except the carpogone fuse with each other to form a large fusion cell of irregular shape. The fusion cell has several narrow protuberances which issue in all directions; each of them gives rise to a gonimoblast initial. Almost all of the gonimoblast cells seem to become carpospores. The mature cystocarp is composed of many small groups of carpospores and the groups are separated from each other by a few vegetative filaments. There is no special pericarpic tissue nor carpostome. The manner of freeing the carpospores was not observed.

Fig. 5. Photograph of a young female plant collected at Shireto Point, Kushiro, 30 Nov. 1955 × 1/3

Fig. 6. Photograph of an apical segment of the plant shown in Fig. 5, to show the dark colored strands on the surface × 1.5

Fig. 7. Microphotograph of a cross section through the strands of the plant shown in Fig. 5 × 28.5

Fig. 8. Photograph of the upper part of a mature female plant preserved in formalin seawater to show the cystocarps on the surface of the apical segments × 1/3

Fig. 9. Photograph of a herbarium specimen of the mature female plant collected by Mr. T. Inaba at Akkeshi, Prov. Kushiro, 16 June 1938 × 1/3

Fig.10. Photograph of the central apical portion of the specimen shown in Fig. 9, to show the cystocarps × 1.5

Fig.11. Photograph of an apical fragment from the specimen shown in Fig. 9 × 1.5

The tetrasporophyte does not differ from the female plant in general appearance of the frond, but when matured it looks dark reddish in color to the naked eye. The tetrasporangia are scattered without any order all over the frond surface with the exception of the stem-like lower portion. They are not among the superficial cells but

are arranged in one layer beneath one to two layers of cortical cells, being transformed from the subapical cell of the anticlinal row of cortical cells. In other words, the development of the sporangia is not apical but intercalary. The sporangia are obliquely cruciate in division.

As understood by the above description of the reproductive organs, the alga in consideration cannot be placed in the genus Erythrophyllum as has been done by Yendo nor in the genus Crossocarpus as suggested with reservations by the same author. Erythrophyllum is characterized by several peculiarities of reproductive organs as described and illustrated by Twiss (1911) in its type species, *E. delesserioides* J. Ag. In that species, the cystocarps and tetrasporangia are formed in papillae which densely cover the frond surface, and the tetrasporangia are not intercalary but apical. Crossocarpus, represented by the single species *C. lamuticus* Rupr., is characterized by the possession of cystocarps in the leaflets that fringe the frond margins.

As discussed by Yendo (1915), *Erythrophyllum delesserioides*, *Crossocarpus lamuticus* and the present alga all possess common peculiarities in the structure of thallus and in having a yellowish homogeneous substance in some of the medullary cells. The content of such cells in the present alga was proved to show the reaction of protein by

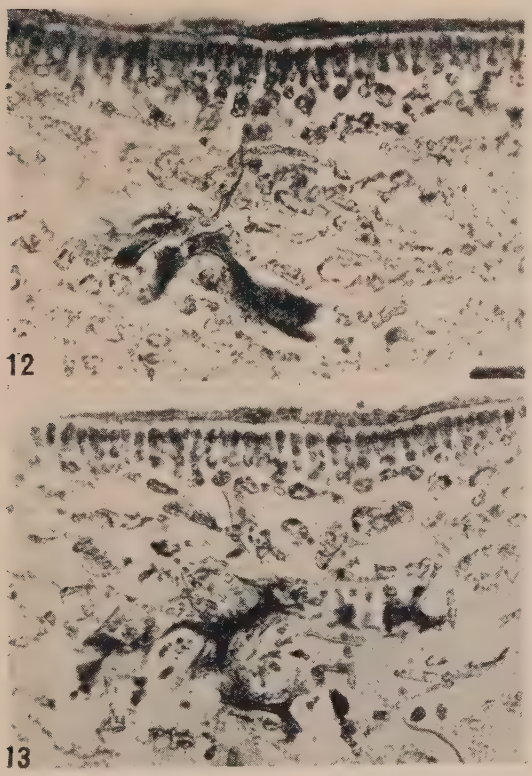


Fig. 12. Microphotograph of a section through a fertile segment of the female plant to show carpogone. (cf. Fig. 15) × 277

Fig. 13. Microphotograph of a fusion cell formed by the carpogonial cells after fertilization (cf. Fig. 16) × 275

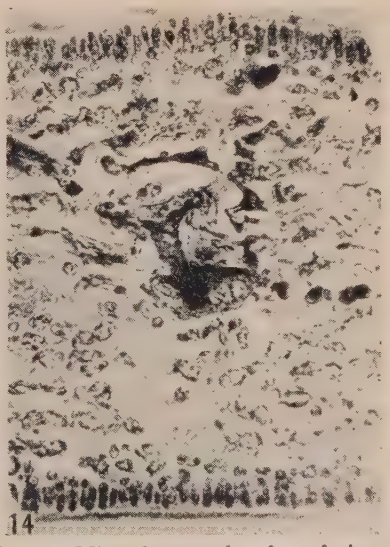


Fig. 14. Microphotograph of a fusion cell giving rise to gonimoblast initials. (cf. Fig. 17) × 215

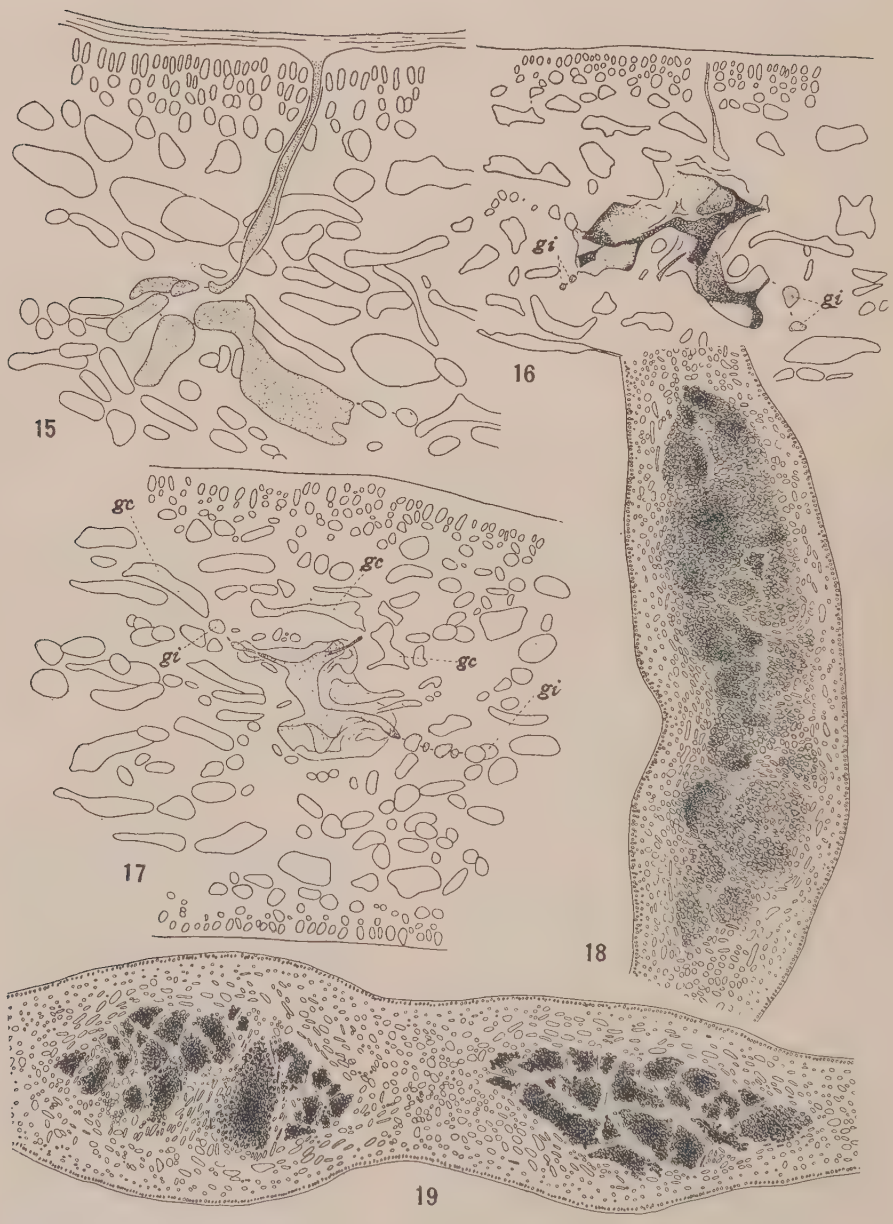


Fig. 15. Camera lucida drawing of the section shown in Fig. 12 × 400

Fig. 16. Camera lucida drawing of the section shown in Fig. 13. *gi*, gonimoblast initial × 275

Fig. 17. Camera lucida drawing of the section shown in Fig. 14. *gc*, giant cell; *gi*, gonimoblast initial × 275

Fig. 18. Longitudinal section through a mature cystocarp to show small groups of carpospores × 75

Fig. 19. Cross section through a cystocarp ringlet × 75

treating with Millon's reagent and to show high density of protoplasm by staining with lactic blue.

In referring the present alga to *Kallymenia Gmelini* Grunow (1870), the writers follow the opinion of Yendo (1915) who examined the original specimens preserved in the Botanical Museum of Berlin. However, such characteristics of the reproductive organs as described above would not allow us to place the species in the genus Callymenia, nor Erythrophyllum, nor any other genus ever described. So the writers wish to establish a new genus for the species and propose to call the present alga *Cirrulicarpus Gmelini* as described below. The new genus is to be classified in the Callymeniaceae.

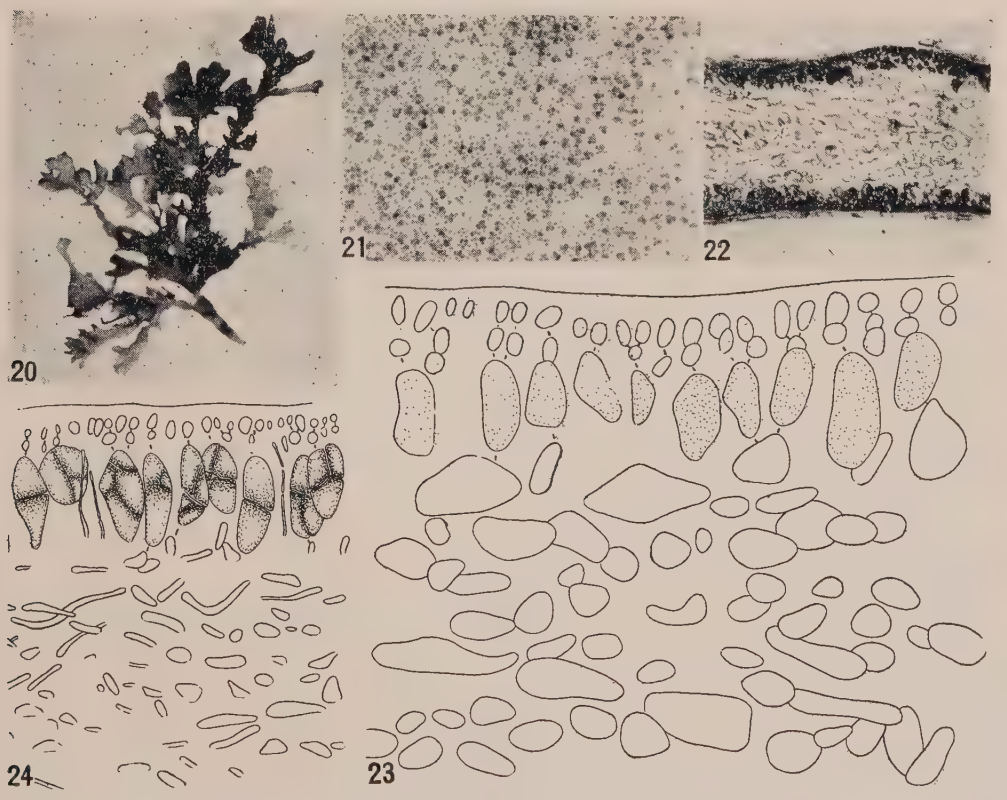


Fig. 20. Photograph of a living tetrasporic specimen, collected at Shireto Point, Kushiro, 30 November 1955 × 1/4

Fig. 21. Microphotograph of the surface of a segment bearing young tetrasporangia × 93

Fig. 22. Microphotograph of a section through the segment bearing young tetrasporangia × 212

Fig. 23. Section through the segment bearing young tetrasporangia to show their intercalary development × 400

Fig. 24. Section through the segment bearing mature tetrasporangia to show their various dividing modes × 275

Cirrulicarpus Tokida et Masaki, gen. nov.

Frond carnoso-membranous, dichotomously or palmately laciniate, consisting of three layers; medullary layer thick, composed of vertically elongated, often filamentous colorless cells and a few scattered gigantic cells with yellowish homogeneous content; subcortical layer composed of a few layers of roundish oblong colorless cells; superficial cortical layer composed of one to three layers of small colored cells in the upper segments and anticlinal rows of several small colored cells in the stem-like lower portion of the frond. Cystocarps in the shape of ringlets, scattered on the surface of the upper segments, composed of small groups of carpospores separated from each other by a few vegetative filaments. Tetrasporangia scattered over the frond surface in one layer beneath the superficial cell layer being transformed from intercalary cortical cells, obliquely cruciate in division. Antheridia unknown.[1)]

Cirrulicarpus Gmelini (Grunow) Tokida et Masaki, nom. nov.

Kallymenia Gmelini Grunow, Alg. Exped. Novara, p. 72, 1870 (specimens from the Kurile Islands: *after* Yendo, 1915); Setchell and Gardner, Alg. N.-W. Amer., p. 307, 1903.

Erythrophyllum Gmelini (Grun.) Yendo, *in* Bot. Mag., Tokyo, 29 (346), p. 230–237, figs. 1–3, 1915; Okamura, Icon. Jap. Alg., 4 (5), p. 90, pl. 172, 1921; *Id.*, Alg. Alaska, p. 89, 1933; *Id.*, Nippon Kaisô-shi, p. 573, fig. 268, 1936.

Japanese name: *Yezo-tosaka* (Okamura).

Type locality of the specimens employed for the establishment of the present new genus: Shireto Point, Kushiro City, Hokkaido (Masaki, 25 March, 1945, October 1948, 12 March 1949, 15 April 1949, 25 November 1949, 14 May 1955, 30 November 1955; Sasaki, 14 January 1956, 2 February 1956).

Distribution: Eastern coasts of Hokkaido from Prov. Kushiro to Prov. Nemuro; the whole Kurile Islands; Aleutian Islands; Alaska.

To avoid superfluousness, here will be given no description of the species other than some data obtained by the measurement of the reproductive organs. The size of the cystocarp ringlets as seen from the frond surface in the formalin specimens is 4.5 × 1.9 mm on the average of 17 samples ranging from 6 to 3 mm and from 3 to 1 mm

1) Cirrulicarpus Tokida et Masaki, gen. nov. Frons carnoso-membranacea, dichotome vel palmate laciniata, stratis tribus contexta; medullari crassi cellulis hyalinis verticale elongatis saepe filamentosis et cellulis gigantis paucis plasmam eodem generem sudflavam complectis compositis; subcorticali paucis seriibus cellularum hyalinarum rotundato-oblongarum compositis; corticali superfici in superiore parte frondis una serie usque tribus seriibus cellularum minutarum coloratarum quamquam in inferiore stipitata parte frondis anticlinalibus seriibus cellularum minutarum coloratarum compositis. Cystocarpia cirruliformia per segmenta superiora sparsa, gregalibus parvis carposporarum filamentis vegetatibus paucis inter se separatis composita. Tetrasporangia per frondem sparsa, in unica serie infra stratum superficum disposita, ex cellulis corticalibus intercalaribus transformia, oblique cruciatim divisa. Spermatangia ignota.

in the maximum and minimum diameter respectively. In the dried specimens mounted on paper, the size of the ringlets is 2.4 × 1.1 mm on the average of 14 samples ranging from 4 to 1 mm and from 1.5 to 0.5 mm in the maximum and minimum diameter respectively. The thickness of the thallus portion containing cystocarps is from 1.00 to 0.77 mm whereas that of the nearby vegetative portion is from 0.55 to 0.30 mm. The mature tetrasporangia are oblong or obovoid in shape and 44 × 18.3 μ in diameter on the average of 37 samples ranging from 58.1 to 32.7 μ and from 27.2 to 12.7 μ in the maximum and minimum diameter respectively. The thickness of the thallus portion containing tetrasporangia is from 0.7 to 0.2 mm whereas that of the nearby vegetative portion is from 0.50 to 0.02 mm.

Résumé

In this paper is reported the discovery of the mature cystocarpic and tetrasporic specimens of the red alga which has been known under the name of *Erythrophyllum Gmelini* (Grun.) Yendo. It was thus made first possible to discuss with certainty the systematic position of the alga which has been uncertain because of lack of precise knowledge about its reproductive organs. Both cystocarps and tetrasporangia are scattered on frond surface, the former in the shape of ringlets in surface view and the latter in one layer beneath the superficial cortical cells in section being transformed from the intercalary cells. A new genus is to be established for the present alga for which is proposed the name *Cirrulicarpus Gmelini* (Grun.) Tokida et Masaki. It belongs to the family Callymeniaceae.

The cost of the present study was partly defrayed from the fund for scientific research granted by the Department of Education.

Literature

Grunow, A. (1870). Algae von Novara. *Reise der österreichischen Fregatte Novara um die Erde in den Jahren* 1857–9. Bot. Teil. 1. Vienna.

Nagai, M. (1941). Marine Algae of the Kurile Islands, II. *Jour. Fac. Agr., Hokk. Imp. Univ.* 46 (2), 139–310, pls. 1–3.

Okamura, K. (1921). *Icones of Japanese Algae.* 4 (5), 85–107, pls. 171–175.

———— (1933). On the Algae from Alaska collected by Y. Kobayashi. *Records of Oceanographic Works in Japan* 5 (1), 85–97.

———— (1936). *Nippon Kaiso-shi.* 964 p. Tokyo.

Setchell, W. A. & Gardner, N. L. (1903). Algae of Northwestern America. *Univ. Calif. Publ. Bot.* 1 (3), 165–418.

Twiss, W. C. (1911). Erythrophyllum delesserioides J. Ag. *Uuiv. Calif. Publ. Bot.* 4 (10), 159–178, pls. 21–24.

Yendo, K. (1915). Erythrophyllum Gmelini nov. nom. *Bot. Mag., Tokyo,* 29 (346), 230–237, figs. 1–3.

DIURNAL RYTHM OF THE FEEDING ACTIVITY OF GOLDFISH IN AUTUMN AND EARLY WINTER

Hachirô HIRATA and Shinjirô KOBAYASHI
Faculty of Fisheries, Hokkaido University

Many reports have been published on the correlation between feeding activity of fish and either light intensity or water temperature or both of them. However, the announced experimental results have not always agreed with one another as Hoar discussed in his paper[1]. Accordingly, it is presumable that the influence of environmental factors on the pattern of feeding activity in fish is not so simple. In fact, Hathaway[2] has found in his experiments on pumpkinseed, bluegill and bass that the food consumption on any one day apparently has little significance, since a day of heavy feeding is often followed by a day on which little or no food is taken. So, to clarify the normal pattern of the feeding activity in a given fish, both the diurnal rythm and the annual variation of the said activity must be studied first from the ecological point of view. Further, unless such a study on fish feeding is executed by means of continuously prolonged observations or recordings, the correlation between any certain sort of behaviour and the environmental factors would not be obtained, since the diurnal rythm of the former is often distorted heavily by the latter which fluctuate not only day by day but also hourly.

The writers have devised an automatic feeding recorder in fish as reported in the preliminary experiment[3]. Using this apparatus, the diurnal rythm of the feeding activity in the goldfish was recorded, and the results obtained were analyzed in relation to some environmental factors.

Nowadays, very little information is available on fisheries meteorology; the only book in this field has been published by Uda[4]. In many guide books for anglers the correlation has been described between angling-rate and climatic factors. However, all such descriptions are those based on the angler writer's own experiences. The results obtained in the present experiment may offer some scientific evidence for both the fisheries meteorologists and the anglers.

The writers wish to express their thanks to the staff members of the Hakodate Marine Observatory for supplying the data of climatic observations used in the analysis of the present experiment.

MATERIAL AND METHOD

The feeding recorder used is the same as that reported in the preceding paper[3]; that is, it was designed to make an automatic recording on a kymograph when fish pecked a bait box suspended in a tank of water. The feeding frequency was calculated by examining the repeated marks of the kymographic record, as indicated in the preliminary

report. A bait box packed with minced dry crustacean larvae was suspended in water to tempt the fish to peck it. The bait was changed every morning for the fresh material. Although by this changing of the bait the feeding behaviour of the fish appeared to be disturbed a little for a short time, the decrease in number of feedings which might be caused to occur seems to be negligible. Immediately after the substitution of the fresh bait, the fish appeared, in most cases, to peck it more frequently for a short time than they had done before the exchange was made.

All the experiments were performed in the same tank set in a greenhouse of the Faculty of Fisheries. The size of the tank is as follows: 140 cm long, 70 cm broad and 45 cm deep. The depth of the water was maintained at about 35 cm, a very little well-water flowing into the tank constantly. Throughout the present experiment 30 young goldfishes were used which had been acclimatized to this tank for about a month before the experiment started.

The feeding records cited in the present paper are those which were taken every day during the period extending from September 20 to December 10, 1955. The average total body length of the fishes used was 43 mm at the outset of the experiment and 52 mm at the end. Comparing the growth of these fishes with that of the control which were fed in the usual manner, no differences were found between them.

As the environmental factors, the water temperature, the air temperature, the atmospheric pressure, the solar radiant heat and the duration of sunshine were measured. Of these factors, the data of the latter three are those which were measured at the Hakodate Marine Observatory which is situated about 4 kilometers apart from the Faculty of Fisheries. So, exactly speaking, the values of the factors concerned may differ slightly from those measured at the location of the Faculty of Fisheries. In most cases, the water temperature was measured several times a day, and sometimes every hour day and night. To avoid the disturbance of the experimental fishes, the water temperature was measured by reading the thermometer which was inserted into a rubber tube, through which the water of the tank was constantly flowing out. The atmospheric pressure was measured every three hours all day. In measuring the solar radiant heat a Robitsch-Actinograph was used. The duration of sunshine was indicated by the every-hour index of from 0 to 10, calculating from the records by a Jordan's Heliograph.

RESULTS

Diurnal rythm of the feeding activity in autumn and early winter

The diurnal frequency of the feeding was highly variable. So, to show the general appearance of the diurnal rythm of the feeding activity, the average frequency per hour was calculated for every ten-day period of the months during which the observations were continued. The results are illustrated in Fig. 1, A–H. As is clear from these figures, the feeding is almost restricted to the daytime throughout the experimental

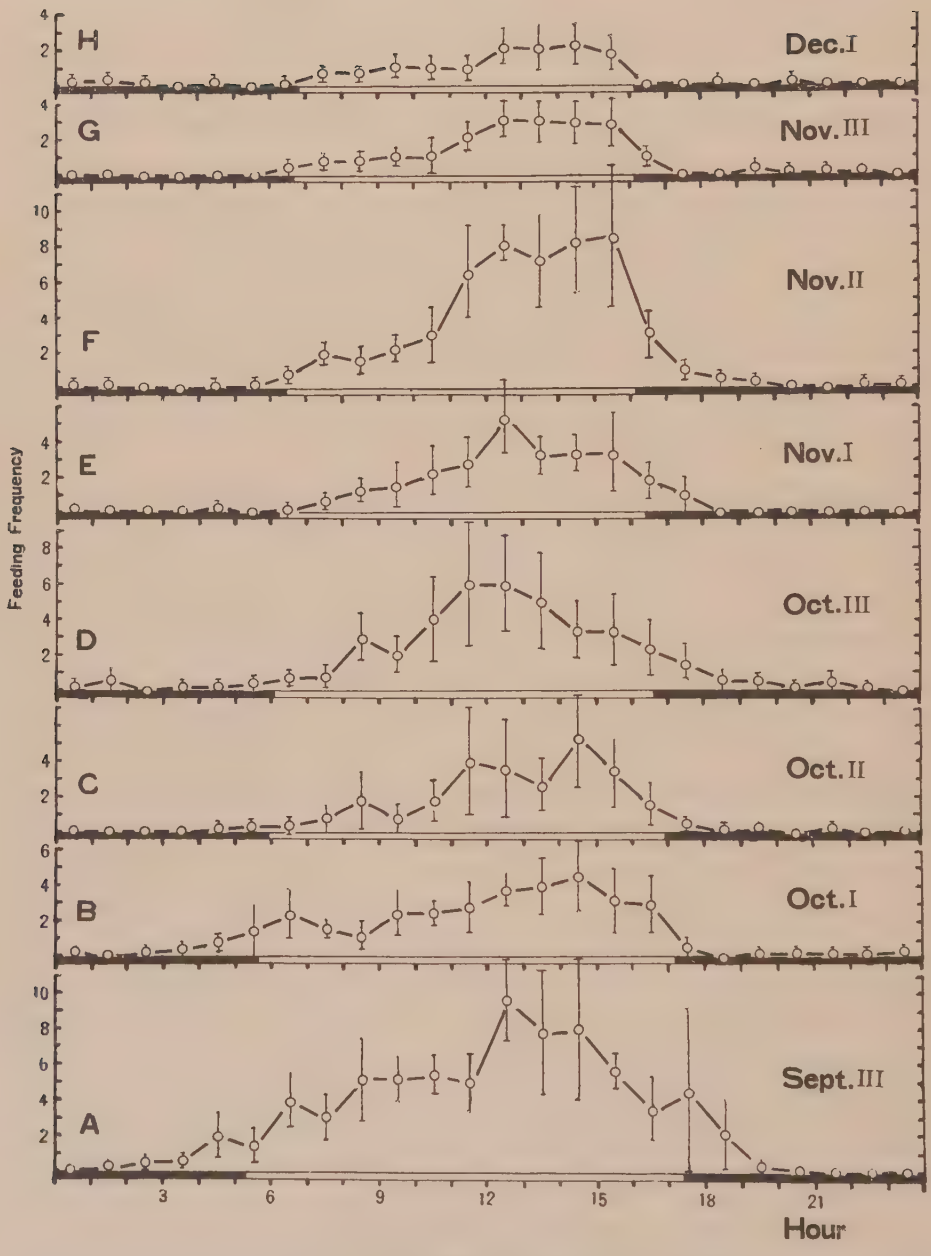


Fig. 1. Time and diurnal rythm of the feeding activity in the goldfish are shown in the average of every decade of days from September to December. The Roman numerals I, II and III mean the first, middle and last decade of every month, respectively. Each bar indicates the standard deviation of the feeding frequency.

period. That is, generally saying, the fishes begin to feed at about daylight, and the feeding frequency increases gradually in the forenoon, then reaches to the maximum in

the time extending from about the 11th hour to the 15th, thereafter decreases, and finally, the feeding ends towards nightfall. It may be natural that the feeding activity decreases gradually according to the passage of the season from autumn to early winter, though the cause of a higher activity of the feeding in the middle decade of November is not clear at present. It is noteworthy that between the seasons of the autumn and early winter there was found a different pattern of the feeding activity in both the time before sunrise and that after sunset. It was found that in the period extending from the last decade of the September to the first decade of October, the feeding begins usually one or two hours before sunrise, while thereafter such a feeding decreases gradually and becomes rare in the period of the early winter. Similarly, the feeding in the evening time continues furthermore one or two hours after sunset during the period extending from the last decade of September to the middle decade of November, while thereafter it comes to a stop with the time of sunset. Further, until the last decade of October, one or two feedings were often recorded in the night time, while such a behaviour becomes rare thereafter.

Correlation between the feeding activity and the environmental factors

As already described in the above, the feeding activity of the goldfish was found to be definitely restricted to the daytime throughout the period of the present experiment. Even from this fact only, it seems to be clear that the light is the main factor controlling the diurnal rythm of the feeding activity in the goldfish. Possibly the other environmental factors may influence the said activity either to accelerate or to inhibit it. Further, it is conceivable that the environmental factors themselves are closely correlated with one another. For example, both solar energy and duration of sunshine are not only related to the light environment in the daytime, but they also influence the

Table 1. Daily fluctuation of the feeding frequency of the goldfish in the period extending from the last decade of September to the first decade of December. Number and the mark of + mean that the recording was interrupted in the course of the experiment on that day.

Month \ Date / Decade	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Sept. III	95	80	47	—	155	79	—	66	25	62	
Oct. I	44	45	43	65	43	37	10	24	26	38	
Oct. II	1	53	68	60	44	2	(17+)	0	26	0	
Oct. III	0	—	(42+)	43	58	46	105	61	52	36	5
Nov. I	40	6	—	(39+)	20	15	24	15	39	51	
Nov. II	29	36	15	116	82	47	85	41	69	30	
Nov. III	3	14	34	18	33	32	15	2	2	40	
Dec. I	33	6	28	17	27	6	2	3	2	21	2

temperature.

Although the diurnal rythm of the feeding activity was clearly recognized, it was highly variable with days. It was not rare that a day of little feeding was followed by a day on which a very high activity of feeding was recorded, as indicated in Table 1. Such a variability might possibly be produced by the effects of some environmental factors. In other words, it may be presumable that the normal form of the diurnal rythm of the feeding activity in the fish is distorted variously by some environmental factors. Although the correlation between the feeding activity and the environmental factors will be studied statistically in future, some brief notes are presented as below.

1. Typical form of the diurnal rythm of the feeding activity

Some examples of the typical form in the diurnal rythm of the feeding activity which were most frequently recorded are illustrated in Fig. 2, A–C, together with the diurnal variations of the water temperature, the atmospheric pressure, the solar radiant heat and the duration of sunshine.

It was commonly found that the maximum activity of the feeding occurs within the time extending from the 11th hour to the 15th, while the water temperature showed usually the highest degree. From this fact, it is conceivable that the feeding activity in

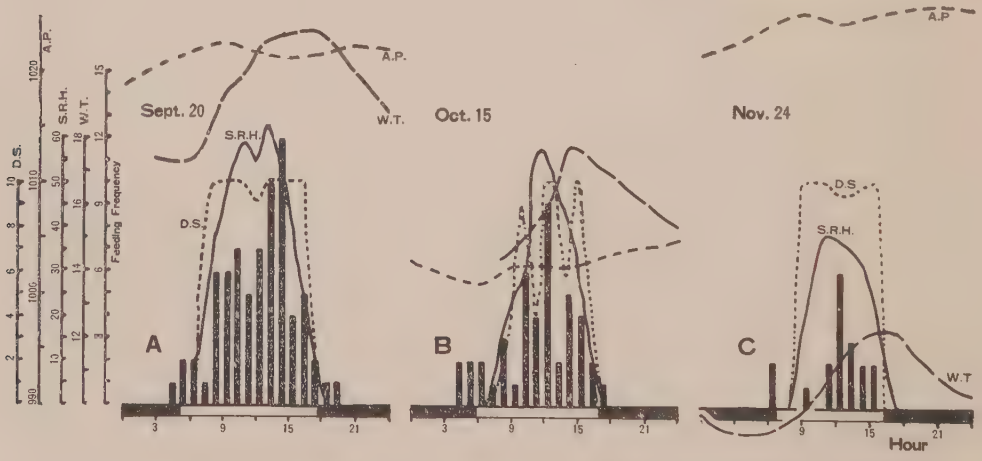


Fig. 2. Examples of the typical form of the diurnal rythm in the feeding activity of the goldfish in correlation with the environmental conditions. Environmental factors: —·—·— water temperature (W. T., C°); ——— solar radiant heat (S. R. H.,cal/cm²); — — — atmospheric pressure (A. P., mb); – – – – duration of sunshine (D. S., every-hour index of 0–10)

the goldfish is closely related with the diurnal variation of the water temperature. Judging from the records which showed the typical rythm of the feeding activity, it can be said generally that the feeding is found to be normal when the water temperature varied diurnally with a normal rythm, i. e., one which shows high temperatures in the

daytime and low in the night time. Further, it appears that when such a diurnal rythm of the water temperature varied more distinctly with higher peaks and lower dips, the feeding rythm is more active and also more distinct. Although it is natural that the feeding activity decreases gradually according to the passage of the season from autumn to early winter, the influence of low water temperature on the said activity was clearly found in the time both before sunrise and after sunset in the period of the late autumn and early winter, as already noted in the preceding section.

Solar radiant heat is considered to be a factor of the temperature environment. When the weather is fine, the diurnal rythm of the solar radiant heat is very distinct, showing maximum at about noontime and minima at about sunrise and sunset, both. Generally, in a typical fine day the water temperature also varied with a distinct diurnal rythm throughout the day, and likewise, the typical form of the diurnal rythm of the feeding activity was usually found. As a rule, the diurnal variation of the solar energy was found to be parallel with that of the duration of sunshine. Naturally, the solar radiant heat decreases from autumn to winter, similar to both the air temperature and the water temperature. The average total solar energy in each decade of the months experimented in Hakodate was as follows: the last decade of September 304 cal/cm^2, the first decade of October 168, the middle 256, the last 263, the first decade of November 151, the middle 186, the last 154, and the first decade of December 186.

The atmospheric pressure of the three days illustrated in Fig. 2, A–C changed diurnally in the range of from 1020 to 1023 mb (September 20), from 1001 to 1005 (October 15) and from 1020 to 1026 (November 24), respectively. In all these observations, in relation to this environmental factor, the feeding rythm was recorded in the typical form, though the seasonal differences were found. Although the absolute value of the atmospheric presssure in the case of October was much lower than the other two, it is commonly characteristic that the pressure varied through the whole day without any marked fluctuation. Therefore, it seems that, regarding the atmospheric pressure which influences the feeding activity of the fish, the absolute value of the pressure itself is not important, but the pressure gradient is really the important factor.

2. Atypical form of the diurnal rythm of the feeding activity

During the experimental period there were found abnormal cases of the feeding rythm which are quitely different from the typical ones described above. Such a few cases are illustrated in Fig. 3, A–C.

(A) September 29 (Fig. 3, A)

The water temperature varied throughout the day with the range of 16.3° to 17.8°C. Accordingly, considering only from the water temperature, it is not likely that such temperature is unfavorable for the feeding. However, the feeding was not active, and furthermore, a few feedings were recorded in the forenoon. It is noticeable that the

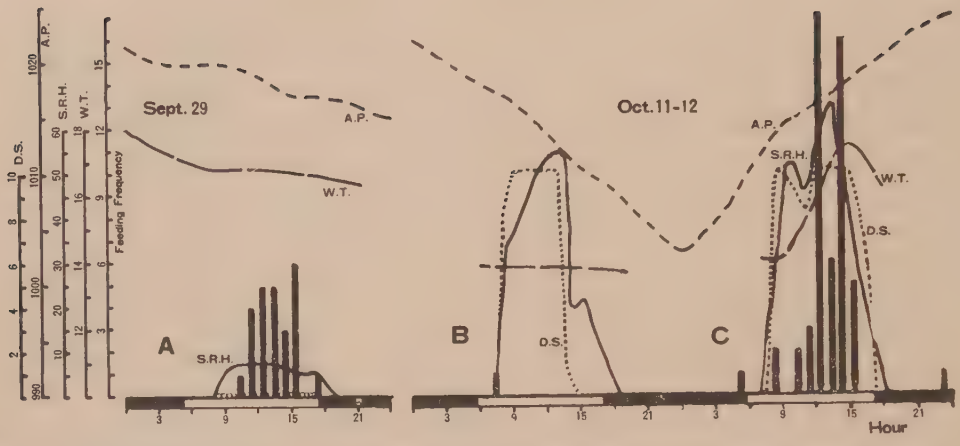


Fig. 3. Examples of the atypical form of the diurnal rythm in the feeding activity of the goldfish in correlation with the environmental conditions. Environmental factors: —— —— water temperature (W. T., C°); ——— solar radiant heat (S. R. H., cal/cm²); — — — atmospheric pressure (A. P., mb); – – – duration of sunshine (D, S., every-hour index of 0-10)

solar radiant heat fluctuated all that day during daylight hours with a low value. Such a low solar energy might produce an obscure diurnal rythm of the water temperature, and might result secondarily in the depression of the feeding activity. If so, it is presumable that a distinct diurnal rythm of the environmental temperature including solar radiant heat, air temperature and water temperature may be an essential factor controlling the feeding activity in the goldfish. This day, the duration of sunshine was zero throughout the daytime. Although the atmospheric pressure varied monotonously the whole day as in the figure, it is not known whether or not such an unusual feeding activity may have connection with the typhoon which struck the southern part of Kyûshû on that day.

(B) October 11 - 12 (Fig. 3, B - C)

On October 11, only one pecking of the bait box was recorded at about the 7th hour. The water temperature varied monotonously in the daytime with the range from 13.6° to 13.8°C. The solar energy dropped suddenly at about the 14th hour from 55 to 15 cal/cm², notwithstanding it had shown normally a rather high value in the forenoon. This day, the Kantô Region was visited by a typhoon, and the atmospheric pressure decreased in Hakodate also with a sharp fall of from 1022 to 1003 mb. Although the sudden depression of the solar energy at the beginning of the afternoon might affect the feeding activity, no feeding in the afternoon might be mainly due to some connection with the sharp depression of the atmospheric pressure. Next day, the good weather was restored as indicated in Fig. 3, C, and the feeding activity returned to the normal pattern of the diurnal rythm. The feeding frequency of this day appeared rather to exceed the average number of feedings in this season. However, it is not clear at present whether such an

apparently compensatory increase of the feeding was due either to hunger or to the recovery of favorable climatic factors, or to both of them. Only, it seems interesting that this increase of feeding is somewhat similar to the fact that there have been, in most cases, good hauls of yellow-fishes in Sagami Bay and also in some other fishing grounds within from half a day to one day and a half after an pressure depression had passed over[4].

(C) October 20

No feedings were recorded this day. The weather was somewhat like that of the combination of the cases (A) and (B). In detail, the water temperature varied evenly in the daytime within the range from 12.9° to 13.4°C; the solar radiant heat passed over the daytime with low value, showing the total 128 and the maximum 27 cal/cm² at the 10th hour; the total duration of sunshine was only 7; the atmospheric pressure depressed with a sharp fall of from 1019 to 1003 mb. Possibly, a complex of the changes of these environmental factors might distort the feeding activity in an unusual manner.

Effect of water temperature upon the cessation of the feeding activity

It is well known that water temperature by which fishes are forced to cease the feeding is closely related with the previous temperature for which they had acclimatized [1,2,5,7]. At least under the present experimental conditions, it was clarified that the young goldfish ceases to feed in early winter at about 8.5°C water temperature. The evidence may be seen in Fig. 4.

In Hakodate, it gets cold towards the end of November. It is not rare in this season that the air temperature falls to about 4° – 5°C, and the water temperature below 8°C at night or before daybreak, though in most days the former rises to higher than 10°C and the latter to higher than 8.5°C in the daytime. In early December, it snowed a few times but not heavily, and in such days the water temperature fell below 5°C at night or before dawn. The daily total solar radiant heat also decreased gradually in this season. That value which was more than 200 cal/cm² in the mean of every decade of both September and October (excepting only the first decade of October) fell to 154 and 186 cal/cm² in the last decade of November and in the first decade of December, respectively.

In such climatic conditions, the feeding activity depressed gradually with days, and then, in the first decade of December the feeding almost ceased for a few days. Further, on both December 10 and 12 a small number of feedings were recorded again, and then, the feeding almost ceased, thereafter.

Upon analyzing the feeding activity during the two weeks illustrated in Fig. 4, one may classify its pattern into the two different categories. The feeding records of the

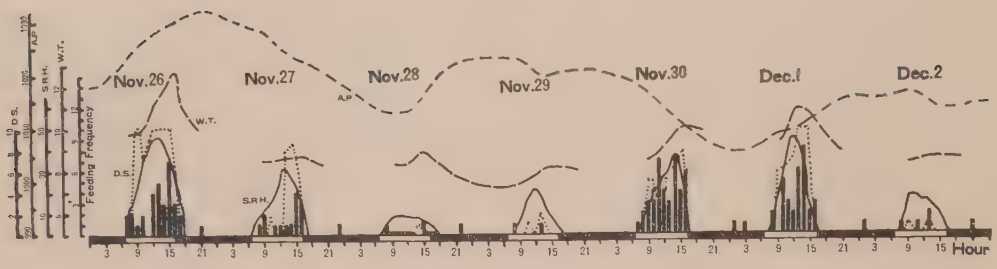


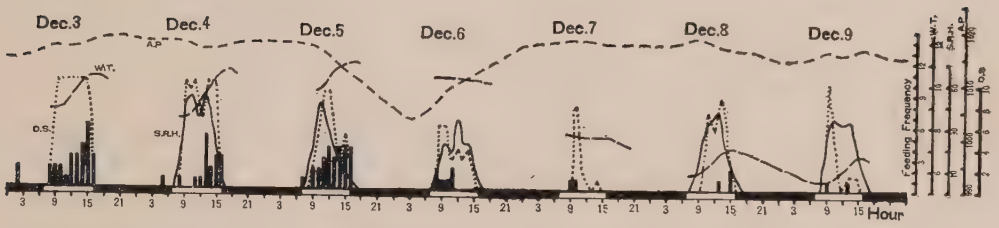
Fig. 4. Depression of the feeding activity of the goldfish in early winter in correlation with ——— solar radiant heat (S. R. H., cal/cm²); — — — atmospheric pressure (A. P., mb);

26th, 27th, 30th of November, the 1st, 3rd, 4th and 5th of December belong to the first group. On these days, the feeding frequency was recorded to be more than 15 times. The second group is composed of the 28th, 29th of November, the 2nd, 6th, 7th, 8th and 9th of December, on which were recorded only less than 6 times of feeding (cf. Table 1).

It seems that these different patterns of feeding activity also might be produced by the diurnal changes of the environmental factors in this special season. In the first group except for the case of November 27, the water temperature measured higher than about 10°C during the time from the 12th hour to the 15th, at which the most active feeding was found. The total solar radiant heat in every day was much higher than that of the second group, showing the lowest 155 cal/cm² on November 27. Although that of December 3 was not measured, it is easily presumable that it might be nearly equal to that of the next day, 258 cal/cm², inferring from the same value of the total duration of sunshine, 77. On November 27, it was cold even in the noontime, both the air temperature and the water temperature showing equally 8.5°C. At any rate, it is noticeable that 15 times of the feeding were recorded this day at about 8.5°C of the water temperature.

On each of the three days extending from the 7th to the 9th of December which belong to the second group, 2 or 3 times of feeding were recorded between the 9th hour to the 15th, at which the water temperature was either approaching to or just at the maximum of the respective day. The maximum water temperature of these days were as follows: 7.5° on the 7th, 7.0° on the 8th and 6.6°C on the 9th. It snowed on the 7th, so the solar energy might be low though it was not measured. On the 8th, the weather cleared up after about the 11th hour, and the total solar radiant heat was 178 cal/cm². In spite of such good weather, on that one day, a temperature environment favorable to feeding by the fish was not produced owing to the cold weather of neighbouring days.

Similarly, feeble feedings were recorded also on both days of November 28 and 29. The water temperature of the former day at the time of the feeding recordings was in



the environmental conditions. Environmental factors: —— —— water temperature (W. T., C°); – – – – duration of sunshine (D. S., every-hour index of 0-10)

the range of from 8.3° to 8.9°; that of the latter day was from 7.4° to 8.1°C. On both days the total solar energy was low, being 63 and 103 cal/cm², respectively. In addition, the rain of the former day, and the rain and snow of the latter day might distort the feeding activity which had already been in a feeble state.

Six times of feeding were recorded on December 2. The water temperature when the feedings were recorded was in the range of from 8.3° to 8.4°C. The weather was cloudy all day long showing the total duration of sunshine only 3; the total solar radiant heat was 102 cal/cm². On December 6, the water temperature in the daytime varied in the range of from 10.0° to 10.2°C. The total solar energy was 155 cal/cm² and the total duration of sunshine 27. So, in view of the water temperature factor only, a feeding frequency of as many as the 17 times of December 4 might be expectable. However, only 6 times of feeding were recorded on this day (December 6) also. Possibly, the depression of the feeding activity in this case may be considered as effects of bad weather conditions such as the rather sharp drop in atmospheric pressure and, further, the forenoon's rain and snow.

From the results described above, it is presumable that the limit of the water temperature for the feeding in the case of goldfish is approximately 8.5°C. Moreover, it appears that in this early winter also the solar radiant heat is an important effective element of the temperature environment, so far as it can act on both the air temperature and the water temperature against the cold atmosphere. The atmospheric pressure, if it varies sharply, also appears to distort the feeble feeding activity in early winter as well as in autumn.

DISCUSSION

In spite of the fact that studies on both the annual variation and the diurnal rythm of the feeding activity in fish have been desired economically and practically for all fish-culturists, there have been very few experiments executed from the ecological point of view, so far as the writers are aware. The automatic recording apparatus used is still not a satisfactory one. For instance, it is a flaw that the number of the feedings are

recorded as the same whether one fish pecked at the bait box or whether several fishes did at the same time. However, even by means of such apparatus the approximate tendency of the feeding activity in the fish may be understood, as described above. Considering from the fact that no difference in the fish growth was found between two groups of the fishes which were fed in a usual manner and reared by the present method, it can be said that the recording apparatus used is favorable for a prolonged experiment.

It is generally accepted in most animals that the diurnal rythm of the behaviour in many cases is not due to the creature's own nature, but that it depends mainly upon the diurnal changes of the environmental conditions[8)–10)]. Accordingly, the degree of the dependence of the feeding activity in the goldfish on the environmental factors must be studied by some analytical experiments in future. However, it can be said from the present experiment that the feeding activity in the goldfish shows a distinct diurnal rythm, and also that annual variation of the said activity may be found.

The daily changes of the water temperature in the tank appeared to be controlled by the fluctuations of the two factors of air temperature and solar radiant energy, reaching the maximum two or three hours subsequent to the maxima of the latter two. The agreement of both maxima in the water temperature and the feeding activity suggests that they are very closely related with each other.

The solar radiant energy has been strongly emphasized by Kato[11)] as an important factor in the study of some insect behaviour. It was found in the present study that the said energy as a factor of the environmental temperature affects similarly the diurnal rythm of the feeding activity in the goldfish. That is to say, even if the water temperature itself were favorable, the feeding activity declined when the amount of solar radiant heat was little. In such a day the diurnal variation of the water temperature was monotonous, not showing the distinct rythm of high in the daytime and low in the night time. Accordingly, it may be said that such a distinct rythm of the water temperature environment is an important factor influencing the feeding activity in the goldfish; further, in some cases the rythm may be rather more important for the said activity than the absolute temperature value itself. In other words, similarly as in the studies on some other animals[10)], such a process of the change in the environmental factors must be taken up for the analysis of the fish behaviour as well as the absolute value itself.

Not only in insects[9)], but also in fishes, there are very few investigations concerning the influence of the atmospheric pressure on their diurnal activities. It was clarified from the present study that the day's progress of the atmospheric pressure with a sharp depression may distort the diurnal rythm of the fish activity, the feeding being inhibited heavily even if both the water temperature and the solar energy appear to be favorable. On the other hand, as described in the case of October 15, even if the atmospheric pressure were low, it may not influence the feeding activity of the fish when the pressure

varies monotonously throughout the whole day.

The depression of the feeding activity in early winter appears to be mainly due to the low water temperature, as shown by Markus' study in the bass[6]. After the diurnal rythm of the feeding activity was distorted repeatedly by low temperature, the fishes are forced to cease the feeding and then to hibernate. Under the conditions of the present experiment, the limit of the water temperature at which the feeding was recorded may be said to be approximately 8.5°C.

Although by analysis of the feedings recorded in the night time they appear to be correlated with the intensity of moonlight, further studies are necessary before any conclusions can be reported on this problem.

SUMMARY

1. Using an automatic recording apparatus, the diurnal rythm of the feeding activity of goldfish was studied in the period from autumn to early winter.

2. The feeding activity is definitely restricted to the daytime; that is, the feeding begins one or two hours before sunrise, reaches the maximum in the hours from about the 11th to the 15th, and ends one or two hours after sunset. As a rule, the maximum in the diurnal rythm of the feeding activity is found in the time interval showing the highest water temperature.

3. From autumn to early winter, the daily feeding frequency decreases gradually with the passage of the days. The feedings before sunrise become rare after early November, and the feeding ceases with the time of sunset after late November. In Hakodate, the goldfish ceases to feed at water temperature below 8.5°C, in early December, after the lapse of several days in states of either no feeding or very feeble feeding.

4. The daily frequency of the feeding is highly variable. Even if the water temperature is apparently favorable for the feeding, the diurnal rythm of the said activity is distorted when the water temperature does not show a distinct diurnal rythm which is high in the daytime and low in the night time.

5. The solar radiant energy is an important factor influencing the environmental temperature. So, when it varies during an entire daylight period with a very low value, the water temperature shows an indistinct rythm without any marked ups and downs. The diurnal rythm of the feeding activity may be heavily inhibited on such a day.

6. When the atmospheric pressure falls sharply, the feeding activity may be severely distorted, its frequency being much decreased. However, even if the atmospheric pressure is low, it does not exert influence upon the feeding activity of the goldfish when the pressure varies monotonously through the whole day.

7. As well as the absolute value in each of the environmental factors, the relative magnitude of the diurnal variation must be taken up for the sake of comprehensive

analytical studies of the fish behaviour.

LITERATURE CITED

1) Hoar, W. S. (1942). Diurnal variations in feeding activity of young salmon and trout. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 6 (1), 90–101.

2) Hathaway, E. S. (1927). The relation of temperature to the quantity of food consumed by fishes. *Ecology* 8 (4), 428–434.

3) Kobayashi, S., Yuki, R. & Hirata, H. (1956). A preliminary test for recording the feeding activity in fish. *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.* 6 (4), 235–238.

4) Uda, M. (1950). [*Fisheries meteorology.*] 226p. Tokyo; Jiipusha. (in Japanese).

5) Fry, F. E. J. (1947). Effect of the environment of animal activity. *Univ. Toronto Studies, Biol. Ser.* (55), 5–62.

6) Markus, H. C. (1932). The extent to which temperature changes influence food consumption in large-mouth bass (*Huro floridana*). *Trans. Amer. Fish. Soc.* (62), 202–210.

7) Hoar, W. S. (1955). Seasonal variations in the resistance of goldfish to temperature. *Trans. Roy. Soc. Canada, Ser. 3, Sec. 5*, 49, 25–34.

8) Park, O. (1940). Nocturnalism—The development of a problem. *Biol. Monogr.* 10, 486–536.

9) Kato, M. (1948). [*Studies on the diurnal activities in insects.*] *Seibutsugaku no Shimpo* (3), 71–119, Tokyo; Kyôritsu Shuppan. (in Japanese).

10) Mori, S. (1948). [*Rythmical activities in animals.*] *Rigaku Monogr.* (14), 133p. Sapporo; Hoppô Shuppan. (in Japanese).

11) Kato, M. (1942). Ecological notes on the activities of some insects coming to the flowers of "Yatude", *Fatsia Japonica*, with special reference to the ecological importance of the solar radiant energy. *Sci. Repts. Tohoku Imp. Univ., 4th Ser.* (*Biol.*) 17 (3), 255–262.

ON THE MECHANISM OF THE APPEARANCE OF THE SCALE STRUCTURE

IV. A Study on the Scale Structure of the Crucian Carp, *Carassius carassius* (L.)

Saburô SAITÔ

Faculty of Fisheries, Hokkaido University

In general, the scale structure of fish has been considered ideally as the best representation of the ecological status of a species, group, or individual. However, it is noticeable that the scale structure differs quite with the different parts of the fish-body, and that it varies somewhat with the growth of the fish, but that in a certain body-portion there does exist a resemblance of the scales of fishes in the same group. On the other hand, the form of fish-body and the number of scales are nearly alike in a species or a group. Therefore, the growth of scale must be in accord with the growth of the fish-body. Therefore, the structure of the scales at a certain body-part may be influenced by the growth of that part. Having these points in mind, the writer studied the scales of the crucian carp and obtained some interesting results which may be useful in the ecological study of fish. Before going further, the writer wishes to express his hearty thanks to members of his laboratory for their help in the collection and handling of materials.

Material

The material of this study was collected by a drag-net for the collection of young fish from three small ponds near the buildings of the Faculty of Fisheries, Nanae-hama, Hakodate, in 1954 and 1955 (Table 1). In 1954 the collection was made twice at the three

Table 1. Material of this study

Date of Collection	May 18, 1954			August 2, 1954			May 7, 1955						
Sex[1]	Male	Female	Young	No Egg[2]	Spawn	Young	Largest Fish Male	Largest Fish Female	2nd Large Male	2nd Large Female	3rd Large Male	3rd Large Female	Smallest Sex Ambiguous
Range of Body-length (mm)	45–109	45–106	16–36	40–91	54–132	10–35	97–105	95–117	75–91	75–90	50–73	49–73	21–49
Average Body-length (mm)	65	70	29	58	75	21	101	107.5	83.2	81.6	60.7	54.1	31.5
Number	32	53	39	80	16	35	2	9	9	11	23	65	263
Total	124			131			11		20		88		263
	637						382						

1) The female was recognized by the spawn, and the male by the sperm or the pearl organ.
2) This group probably includes males and the spawned females. The duration of this fish's spawning is so long that it continues from May to August.

ponds on the 18th May and the 2nd August. The fishes were used for such general studies as the scale arrangement on the body surface, the scale form or the general

scale structure at the different body-parts. The fishes of 1955 which were collected once at one pond on the 7th May, were employed for a study on the correlation of the scale structue with the stage of the growth of fish.

The ponds are artificial soak ponds laid out in 1927 for the ship wood materials of the Nichiro Fisheries Company[1]. Their dimensions are respectively 76 × 8, 50 × 8, 25 × 8 m; the water depth is about 1 meter, and the depth of mud about 15 cm; there is no outlet and no streams drain into them. The water is relatively clear, neutral in hydrogen-ion concentration. Found therein are the crucian carp, the loach (*Misgurnus anguillicaudatus* (CANTOR)), and the stickle-back (*Pygosteus sinensis* (GUICHENOT)) and such insects as *Anax parthenope*, *Kirkaldia deyrolli* VUILLEFROY, *Ranatra chinensis* MAYER, *Hydrophilus acumiratus* MOTSCHLSKY live. Plants growing there are the iris (*Acorus calamus*), the reed (*Phragmites* sp.), the willow (*Salix* sp.) at the margin, and the duckweed (*Potamogeton pusillus* L. and *Myriophyllum* sp.) at the bottom.

As above stated the ponds are small and not connected with the other waters, therefore there is no doubt that all specimens used in this study belong to a simple fish-group living under the same ecological conditions. The truth of this conjecture can be easily proved by the fact that the correlation curve of the body-depth to the standard body-length is nearly a straight line (Fig. 1). The body colour is reddish-brown or yellowish-brown irradiating goldish, and the ratio of body-depth to the body-length shows 25/67 in male and 12/35 in female in average. Thus the body-depth is relatively low, and so, the present material belongs to Kin-buna (goldish coloured fish) according to Y. Okada and M. Nakamura (1948)[2].

Three frequency curves of the body-length present respectively two distinct modes (Fig. 2), and it is sure that each mode represents a fish-group hatched in the same period, but the conclusion that the mode corresponds to an year-group is hasty in such fish of a long spawn-period as this species. The similarity of the two curves of two groups in May of two separate years is axiomatic, representing two distinct modes at 20-40 mm and 45-75 mm. In May fishes have still not spawned, accordingly, even the first mode ought to mean the fishes hatched in the preceding year. However, two modes in the curve of a group collected in August 1954 are quite different in the meaning; the first mode of the smallest body-length probably shows the fishes hatched in the early spring of that year, accordingly, it is obvious that the second mode represents the

1) The history of ponds was examined carefully by Mr. Yasunosuke Inoue of this Faculty, to whom the author must express here his sincere thanks.

2) Y. Okada and M. Nakamura (1948) distinguished Kin-buna as an independent race from Gin-buna (silvery coloured fish), Gengorô-funa. According to them the sex-ratio of Kin-buna is 1, but in the present specimens the female is above the male in number; especially in the material of May 1955 the ratio was 34 to 85. T. Kafuku (1952) recognized also three forms within the species on the basis of digestive organs, treating the same material as Okada and Nakamura from a small lake, Jô-numa, in Gumma Prefecture.

Fig. 1. Graph of correlation between standard body-length and body-depth

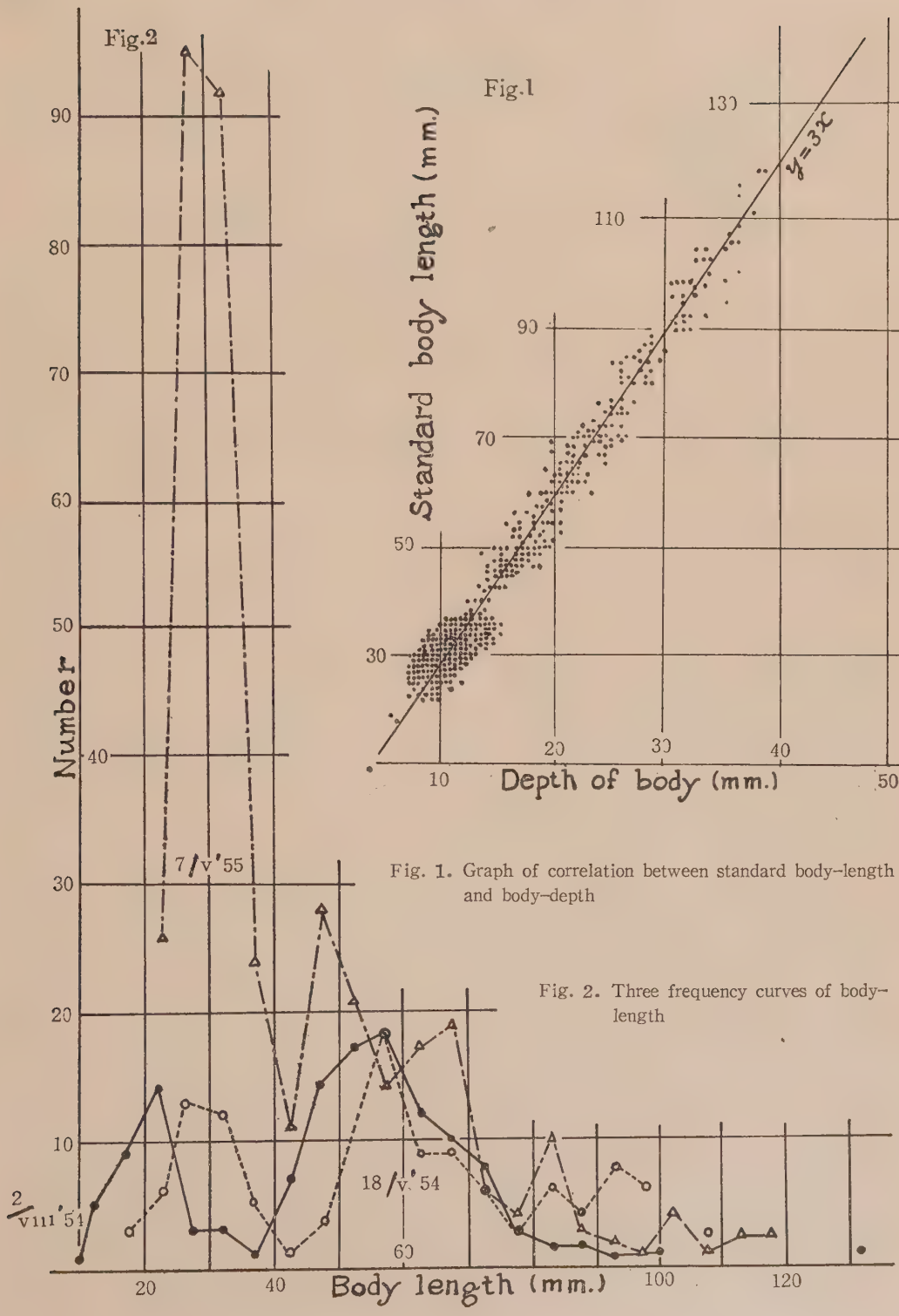


Fig. 2. Three frequency curves of body-length

growth of fishes in the first clear mode of collection in May. The individuals above 80 mm in body-length decreased rapidly in number in each collection in May and August. This fact suggests that there is a critical point of natural reduction in number of individuals at this body-length.

Method

The observations were made on specimens which were fixed with 10 per cent. formalin immediately after collection. Some fishes as the sample for the general study of scale were chosen arbitrarily, then all scales of each fish were arranged on a slide-glass. By this treatment the mutual position of each scale was not disturbed, and moreover, the lateral line, the perpendiculars to the lateral line from the anterior or the posterior ends of dorsal fin, and the positions of anal, pectoral, ventral, fins were marked distinctly. For the purpose of the comparative study of the corresponding scales at both sides of a fish, all scales of both body-sides were arranged in correspondence in two rows on a slide-glass.

For convenience of description, the scale row furnished with the lateral organ was treated as the basis or the middle row (M), and the rows above and below were called respectively the upper first, second etc. (U_1, U_2, ···) or the lower first, second etc. (L_1, L_2,···). Moreover, scales of each row were named the first, second etc. (S_1, S_2,···) from the front towards the back. With microscopical observation on such prepared slides, representations of all scales were drawn on a sheet of paper. In this manner, the scale-maps were completed, in which were noted the special form, the position and number of complete and incomplete radii, the longitudinal and transverse diameters[3] (LD, TD), the radius- and circulus-number of the anterior scale-part. The regenerated scale was measured for its longitudinal and transverse diameters, and besides, the longitudinal diameter of the central part lacking the circulus was also measured.

For the study of the changes of scales accompanying the growth of fish, all fishes in the largest and the second groups, 10 males and 10 females of the third group and 20 specimens of the smallest, sex ambiguous group, that is 71 fishes in total, were chosen by random sampling from the fishes collected in 1955. Then, the scales at four definite positions of these 71 fishes were prepared as the sample for detailed study ; one scale each from the upper first (U_1B) and third (U_3A) rows on a perpendicular from the anterior end of the dorsal fin to the lateral line, and one scale each at the lower first (L_1D) and the upper first (U_1C) rows on a perpendicular from the basal point of the anal fin (Fig. 3). To determine distinctly these four positions, at first the fish was put on a cross drawn on a sheet of paper so that the lateral line would agree with the

3) The longitudinal is a diameter corresponding to the fish-body axis through the nucleus, and the transverse is a perpendicular to the above through the nucleus. The measurements were made by the aid of a micrometer.

Fig.3

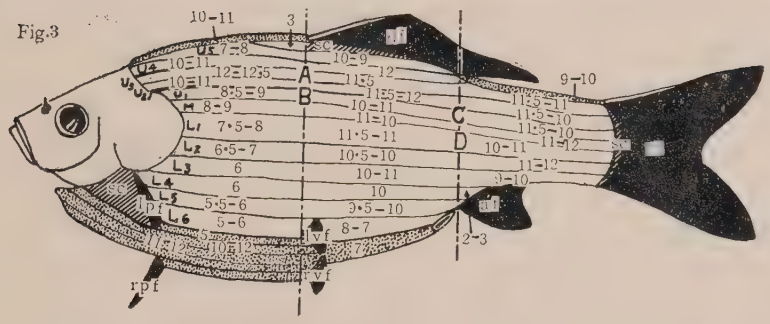


Fig. 3. Arrangement of scales on body surface
$L_1, 2, \cdots$, the lower first, second, ··· rows of scale; M, scale row of lateral line; $U_1, 2, \cdots$, the upper first, second, ··· rows of scale; af, anal fin; df, dorsal fin; lpf, rpf, left and right pectoral fins; lvf, rvf, left and right ventral fins; tf, tail fin; sc, small scales (part of oblique lines); A, B, C, D, scales which were used to secure data of correlation between diameters of scale, position of scale-nucleus and body-growth. Dotted part shows the upper edge and the under surface.

transverse line of the cross. Then, the fish was moved until the longitudinal line of the cross coincides with each perpendicular from the basal point of the dorsal or the anal fin to the lateral line. At last, the intersecting point of the scale row with a hair which coincided with the longitudinal line of the cross shows the definite position.

The slide of such chosen scales was magnified about 40 times by a magic-lantern apparatus for consideration to check any large error, and then the several portions of the scale measured. The diameter of the scale corresponding to the fish body axis is named the longitudinal diameter of the scale, and that corresponding to the body-depth is called the transverse.

Observation

I. Number and General Form of Scales

The body except the head is covered with cycloid scales which are nearly pentagonal in form, but such several small parts as the levator muscle of the pectoral fin, the neighborhood of the cloaca, and the bases of ventral and dorsal fins, are covered irregularly with small oval scales. Moreover, at the upper edge of body, namely from the supraoccipital bone to the dorsal fin and from the dorsal fin to the tail fin, there is a row of special shield-formed scales which are so long extraordinarily in their longitudinal diameters, and scales at the under surface so delicate that it is difficult to exfoliate them completely. The present report is confined to a study on the pentagonal scales covering the main body surface (Fig. 3).

In general, as to the pentagonal cycloid scale, the anterior margin in the young fish is straight, and the upper and lower margins are in parallel with each other, but as the fish grows the anterior margin comes to show jaggedness. The variation of scale

number is relatively narrow[4]. Though the average number of scale on each row in three portions is as fig. 3, the number of seven rows which succeed to the small scales at the base of tail fin is affected diversely with the small scales.

II. Longitudinal and Transverse Diameters of Pentagonal Scales

So far as the fishes of the same body-length are concerned the relation between the longitudinal and transverse diameters of scale at a given position is nearly definite. In general, in each scale row the anterior scale shows a shorter longitudinal than the transverse, and as the position follows posteriorly both of them increase gradually. For example, the two diameters of scales of specimens, 7 mm in standard body-length, attain the maximum at about the perpendicular from the anterior end of the dorsal fin to the lateral line, and then they decrease gradually. In this case, the transverse decreases sooner than the longitudinal, and so, in each row the longitudinal is greater without exception than the transverse in all scales positioned behind the perpendicular from the anterior end of anal fin to the lateral line. However, the maximum of transverse diameter appears more anteriorly in the lower scale-rows than in the upper scale-rows,

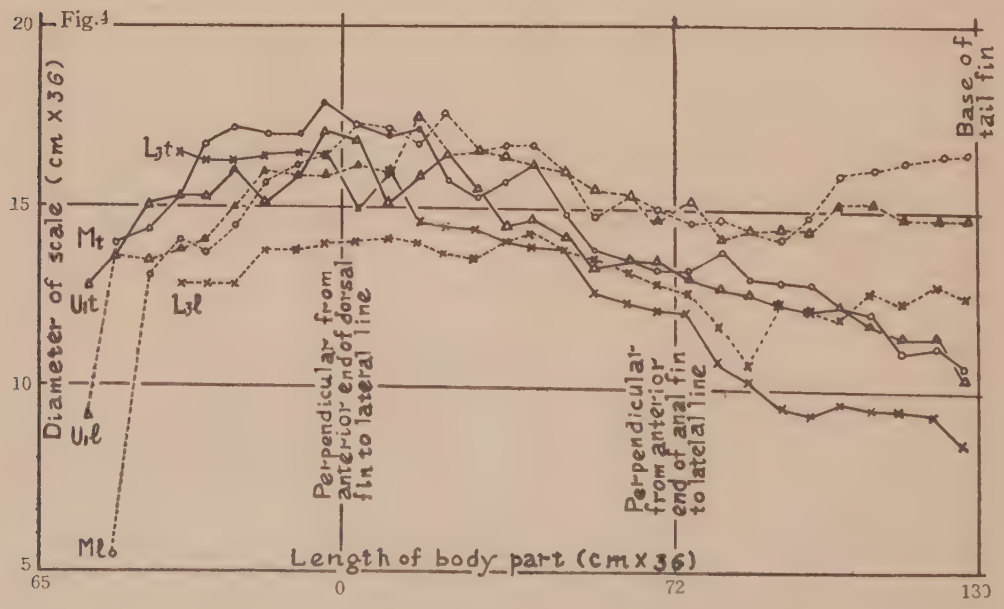


Fig. 4. Graph of average diameter of scales from five specimens of 7 cm in standard body-length

M, scales with lateral organ; L_3, the lower third scale-row; U_{1_2} the upper first scale-row; l, longitudinal diameter; t, transverse diameter.

4) The scales constituting the lateral line in the present material numbered 29 to 32. This is a narrower variation than the observation, 27 to 35, published by T. Kafuku (1952) on Kin-buna from Jô-numa.

and in each row the maximum of the longitudinal has a tendency to appear more posteriorly than the maximum of the transverse (Fig. 4).

The relation between the two diameters somewhat varies with the growth of the body-length, and the increments of the diameters differ from each other by the different body-parts. Accordingly, any scale of a large fish differs from that at the correspondent position of a small fish in the relation between the two diameters.

The scales at four positions (U_1B, U_3A, L_1D, U_1C) of 71 samples which were chosen from the fishes collected in 1955 by the above mentioned method show the following tendency : the difference of the two diameters of scales at the anterior part (U_1B, U_3A) diminishes according to the growth of the fish, namely, in the small fish the longitudinal is obviously shorter than the transverse, but when the fish grow to about 10 cm length the two diameters come to be the same. On the contrary, at the posterior part (L_1D, U_1C) the difference between the two diameters becomes more divergent

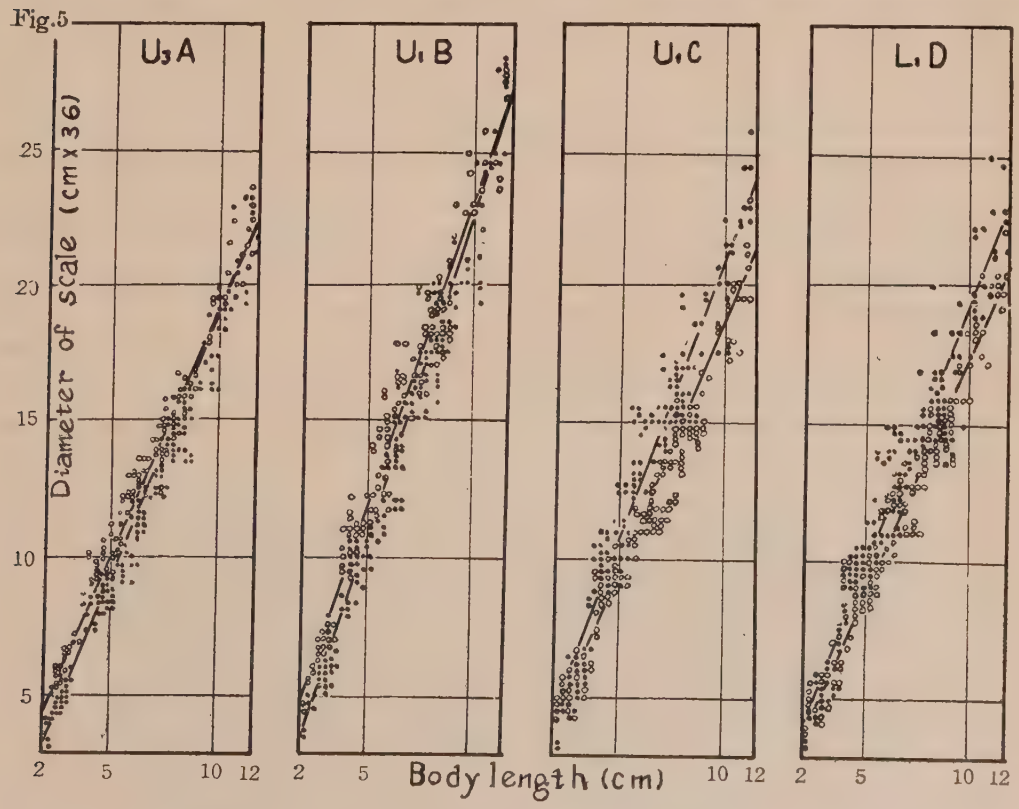


Fig. 5. Correlation curves between fish-growth and diameters of scale
Black spot, longitudinal diameter ; white spot, transverse diameter ; U_3A, U_1B, scales of the third and the first upper rows on a perpendicular from anterior end of dorsal fin to lateral line; U_1C, L_1D, scales of the first upper and lower rows on a perpendicular from anterior end of anal fin to lateral line (see fig. 3).

with the growth, that is, in the large fish the rate of the longitudinal to the transverse becomes superior to that in the small fish. In other words, in the growth of the fish every scale grows more rapidly longitudinally than transversely, namely, the ratio of the longitudinal to the transverse increases with the growth of the fish (Fig. 5).

III. Position of Scale-nucleus

The writer reported in brief on this problem in a previous paper (1953). He has now had further opportunity to make more detailed researches. The scale grows sooner in a forward direction, accordingly it results that the relative position of the nucleus moves backward with the growth of the fish.

In general, the ratio of the anterior radius to the longitudinal diameter of a scale increases with the body-growth of the fish, but the difference of increase of this ratio is obviously recognizable between the both sexes. Namely, the increment of male is slow, but the female shows a rapid increasement. Consequently, in the third fish-group, 49–73 mm in body-length, the ratio is smaller in the female than in the male, while in the second group, 75–91 mm in body-length, it becomes nearly alike in the two sexes ; in the largest group, 95–117 mm in body-length, the ratio of the female contrarily becomes superior to that of the male. The increment of ratio differs also with the different positions. In the female, by the growth from the third group, 54.1 mm in average body-length, into the largest group, 107.5 mm in average, the increases of the ratios at the four positions, U_3A, U_1B, U_1C and L_1D, show respectively as follows: 0.039, 0.024, 0.031 and 0.042.

The correlation between the number of circuli[5] at the anterior part of a scale and the longitudinal diameter of that scale shows a direct proportion. In fishes below 70 mm in body-length, the scale at U_3A is specially inferior in circulus number to the scales at U_1B, U_1C and L_1D. The three latter are nearly the same in circulus number and in length of longitudinal diameter (Fig. 4). However, with the subsequent body-growth the scale at U_1B comes to surpass the others in increment of circulus. There is an indistinct tendency for the increment of circulus to be more great in the central body-part than in the periphery.

IV. Regeneration of Scales

The regeneration scales vary in number with each individual, but the positions are scattered in a manner to display a certain tendency. According to the examination on twenty fishes, 53–65 mm in body-length, the body surface can be divided into three areas by the degree of density of the regenerated scales. The wedge-formed area extending from the anterior M–L_5 to the posterior U_1 is the most compact, where the

5) The "number of circulus" was decided by the method of enumerating the circuli crossing with the anterior radius.

Fig.6

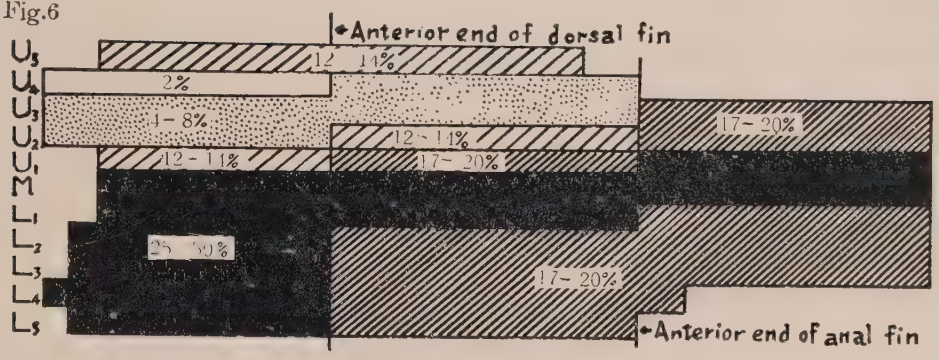


Fig. 6. Dispersion-map of regenerated scales, showing that regenerated scales are most likely to occur on the belly

regenerated scale reaches a value of 25–50 per cent. In the remaining part of the belly and the part from median U_1 to posterior U_2–U_3, regenerated scales amount to about 17–20 per cent. The greater part of the back shows decrease to a value of 2–14 per cent. (Fig. 6).

The small fish has a few regenerated scales, but with the growth of the fish they increase rapidly. Four groups of specimens collected in 1955 show respectively 9, 27, 45, 53 in number of regenerated scales. Moreover, in the third group there is no recognizable difference between the two sexes in number of regenerated scales. However, increase in body-length accompanies the rapid increase in number in female, while in the male it is nearly inchangeable, and consequently the relative number of regenerated scales of male and female in the largest fish-group diverges 15 to 29.

Among the regenerated scales of the large fishes, two different types of the regeneration-process are noticed. The first type (Fig. 7b) showing the structure of the

Fig.7

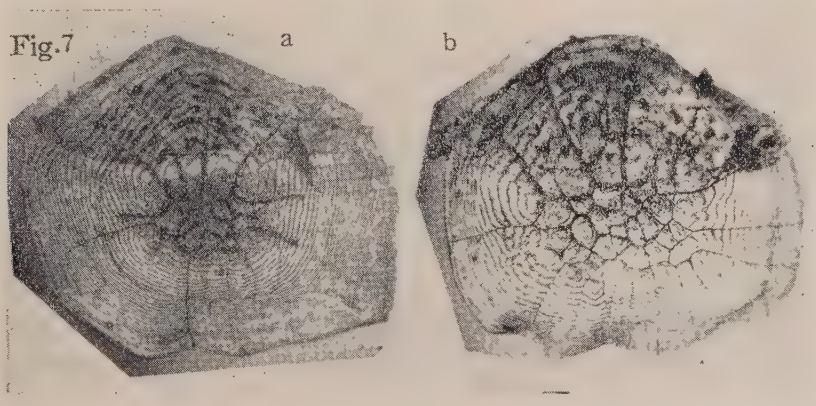


Fig. 7. Two types of regenerated scale on right side of a fish, 76 mm in body-length, collected on May 18th, '54
a, L_2S_{18} regenerated in the second preceding year; b, L_3S_5 regenerated in the preceding

early regeneration, can be guessed to have occurred in the previous year. The other type (Fig. 7a) shows a more advanced structure. There is no doubt that it was regenerated in the second preceding year because the central net-worked figure is constricted to a small area. The regenerated scales are unexpectedly numerous, and as above mentioned they are found specially at each side of the belly. The writer thinks that these numerous regenerated scales are chiefly a result of the falling off from abrasion due to sexual acts during the spawning season. If he guesses right, two types of regenerated degree may represent two times of the spawnings.

Conclusion

The scales at the different parts of a fish differ in structure; there is resemblance between the structure of the corresponding scales of different fishes. Moreover, with the growth of fish-body, the scale at a certain position may grow under a general rule that is definite in the species. The writer attempted to determine clearly whether or no such rule may exist, using 637 specimens of *Carassius carassius* (L.) collected from three small ponds at Nanae-hama, Hakodate City.

The pentagonal cycloid scales covering the best part of fish-body are simple at the margins in the young fish, but they come to have jaggedness at the anterior margin with growth. This was also reported by H. Kobayasi (1938). The jaggedness appears at about the time when the growth of body length has reached about 4.5 cm. It is interesting that H. Kobayasi (1954) pointed out that the ctenoid scale at the stage of early development represented the structure of the cycloid scale.

The nucleus changes in relative position because the growth of scale is more rapid anteriorly than posteriorly. Accordingly, at the young stage the nucleus exists rather at the anterior part, but with the growth it moves towards the posterior part.

The number of scales furnished with the lateral organ in the material of this study is narrow in variation, 29 to 32, comparing with 27 to 33 (mode, 29) of Kin-buna reported by Y. Okada and M. Nakamura (1948)[6], and is many more than about 27 according to Y. Okada, K. Uchida and K. Matsubara (1935). In fact, this fish so varies greatly that several varieties and races are admitted, and so, not only the number of scales but also the other characteristics are different according to the life-environment.

The increments of both diameters of scales from the different body-parts are different. This fact shows a rhythmic growth of the different body-parts. In specimens under 10 mm in body-length, the depth of anterior body-part is relatively large, but marked growth in the length of body as a whole follows. Accordingly, with the growth of body, the scale grows with greater rapidity longitudinally than transversely. The backward growth of scale is minute, and the longitudinal growth is due mainly to the

6) According to their study, Gin-buna and Gengorô-funa show respectively 28 to 31 (mode, 29), 29 to 33 (mode, 32) in number of scales furnished with lateral organ.

forward growth. This results in the shifting of the scale-nucleus towards the posterior in relative position. The speed of growth of scale or of the body-length is faster in the female than in the male.

The regeneration scales of the present material are many more in number than those of *Abramis brama* L. and *Carassius carpio* L. reported by W. Wunder (1949). According to him, the regenerated scales are especially recognizable in the anterior one fourth body-part and in the tail stalk. The present results corroborate his conclusion guessing that these parts are easy to remove by the rubbing and the damage.

The number of types of the degree of regeneration may be connected with the conjectured spawning-times. However, if the scales can be regenerated completely as was reported on the gold-fish by R. Suzuki (1952), this view is nonsensical. R. Suzuki observed the complete regeneration within only 180 days, but on the contrary on the same fish, W. Wunder (1949) reported that the regenerated scale after four years differs still from the normal scale; the subject fairly begs for further investigations.

Literature cited

Kafuku, T. (1952). Races of wild gold-fish with special reference to the digestive tract. *Bull. Freshwater Fish. Res. Laboratory.* 1 (1), 41-51. (in Japanese).

Miyadi, D. (1940). [Fresh-water fishes from Manchoukuo]. *Kantô-shû oyobi Manshû-koku Rikusui-seibutsu Chôsasho.* (in Japanese).

Kobayasi, H. (1938). Comparative studies on the scales of Japanese Cyprinids (V). *Botany and Zoology* 6 (9), 1498-1510. (in Japanese).

———. (1954). Distinction of cycloid and ctenoid scales. *Zool. Mag.*, 63 (6), 254-255. (in Japanese).

Okada, Y., Uchida, K. and Matsubara, K. (1935). [*Fish of Japan*]. Tôkyô & Ôsaka. (in Japanese).

——— and Nakamura, M. (1948). Studies on the scales of *Carassius carassius* (L.) in Japan. 1. *Carassius carassius* (L.) in Jô-numa, a small lake in Gumma Prefecture. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 13 (6), 279-284. (in Japanese).

Saitô, S. and Yamada, J. (1953). The scale structure of the crucian carp examined with the regeneration. *Mem. Fac. Agr., Hokkaido Univ.*, 1 (4), 555-560. (in Japanese).

Suzuki, R. (1952). The change in the structure of regenerated scales of goldfish. *Jap. Jour. Ichthyology*, 2 (4/5), 192-195. (in Japanese).

Wunder, W. (1949). Beobachtungen über Schuppen-regeneration beim Goldfish (*C. auratus* L.), beim Karpfen (C. *carpio* L.) und bei der Brachse (*Abramis brama* L.). *Roux Arch. Entw. Organism*, 143, 396-470.

越後能生及び附近沿岸産海藻目録

斎藤譲
（能生水産高等学校）

List of the Marine Algae from Nou, Echigo Province, and its Vicinity

Yuzuru SAITÔ

Abstract

The list of the marine algae here presented contains 136 species known from Nou, Echigo Prov., and its vicinity on the Japan Sea side of Honshu (Main Island of Japan), of which 9 species belong to Chlorophyceae, 35 species containing one form to Phaeophyceae, and 92 species containing 12 forms to Rhodophyceae. Of these algae, 115 species were collected by the writer himself at Nou, Kodomari, or Momogawa, during the period lasted from April 1954 to July 1955, while 21 species have been reported from Nou by previous authors but not collected by the writer yet. The following 8 species are worthy of special mention: *Galaxaura fastigiata* has been known to have its northern limit of distribution at Toyama Bay, Etchû Prov. (Okamura, 1936, p. 445) but is now ascertained by the writer's collection to distribute beyond the Bay as far northeast as Nou; *Enteromorpha plumosa*, *Acrothrix pacifica*, *Rhodochorton Daviesii*, *Hypnea chordacea*, *Hypnea nidulans*, *Callithamnion corymbosum*, and *Callithamnion callophyllidicola* are reported here for the first time to occur on the Japan Sea coast of Honshu, of which *Hypnea chordacea* is new to the marine flora in the present territory of Japan.

新潟県能生及び附近沿岸の海藻については断片的な記録があるほかは，今日までまとまつた報告は未だ出ていない。筆者は昭和29年6月能生水産高等学校に赴任して以来，附近沿岸の海藻調査を計画し，30年7月までの間，毎月1回又は2回，岩礁やタイドプールに恵まれた能生，小泊又は百川で採集を行い，腊葉とホルマリン漬の標本を作つたが，偶々30年7月から12月までの6ヶ月間，産業教育振興法による内地留学生として北海道大学水産学部水産植物学教室で，教授時田郁博士指導のもとに研究に従事する機会を与えられたので，上記標本の査定を行つた。それと共に文献をしらべ能生が産地として挙げられている種類を拾い上げ，合計136種の目録を作製することができたのでここに発表する。このうち9種は緑藻，35種1品種は褐藻，92種12品種は紅藻に属する。この136種のうち21種は文献に能生が産地としてあげてあるが筆者の未だ採集できなかつたもの（目録中に※印を附して示す），18種は文献に能生（内1種は附近地名）が産地としてあげられており筆者も採集できた種類（●印を附して示す），これらの合計38種を除いた残り98種は文献に能生又は附近の地名が産地としてあげてない種類で，その多くは本州の日本海沿岸に分布することが文献によつてわかつている。ただ次に挙げる8種は分布上注目に値するものである。

即ち，*Galaxaura fastigiata* ガラガラは日本海沿岸では富山湾以南に分布することが知られていたもので（岡村1936，p.445），能生の採集品中に本種を見出したことは，日本海沿岸の本種の分布北限が富山湾をこえて能生附近に在ることを示すものである。又，次の7種は本州の日本海沿岸に分布することが今回はじめて知られた種類である（目録中に種名を太字で記して示す）。

Enteromorpha plumosa ワタゲアオノリ，***Acrothrix pacifica*** ニセモヅク，***Rhodochorton Daviesii***, ***Hypnea chordacea*** ヒモイバラ，***Hypnea nidulans*** ムラサキコケイバラ，***Callithamnion corymbosum***, ***Callithamnion callophyllidicola*** キヌイトグサ。

このうち ***Hypnea chordacea*** は今日まで台湾と Java に知られていたもので（田中1941, p. 230），本州は勿論，今日の日本国内として新発見のもので日本新産（New to Japan）と言うことのできる種類である。

この目録作製にあたつて御指導と校閲を賜わつた恩師時田郁教授に深く感謝すると共に，この研究のために種々便宜を与えられ御助言を忝くした能生水産高等学校長野中一郎先生はじめ職員諸賢に厚く御礼を申し上げる。

CHLOROPHYCEAE 緑藻綱

Cladophoraceae シオグサ科

1. Chaetomorpha melagonium (Web. et Mohr) Kütz.　ハリガネジュズモ
岡村1936, p.67; 東1936, p.1; 大島1950, p,11.
能生（斎藤1954，5月）.

⊙2. Chaetomorpha moniligera Kjellm.　タマジュズモ
岡村1936, p.66; 東1936, p.1; 高松1939, p.27; 大島1950, p.12.
能生（斎藤1954，9月；岡村1936）.

3. Cladophora glaucescens (Griff.) Harv.　ハイイロシオグサ
岡村1936, p.55; 東1936, p.1; 高松1939, p.26; 大島1950, p.10.
能生（斎藤1954，5月）.

4. Cladophora albida (Huds.) Kütz.　ワタゲシオグサ
岡村1936, p.54; 東1936, p.1; 高松1939, p.26.
百川（斎藤1954，9月）.

Ulvaceae アオサ科

5. Enteromorpha plumosa Kütz.　ワタゲアオノリ
岡村1936, p,18.
能生（斎藤1954，10月，1955，7月）. 本州日本海沿岸新産種.

6. Enteromorpha Linza (L.) J. Ag.　ウスバアオノリ
岡村1936, p.15; 東1936, p.1; 大島1950, p.7.
能生（斎藤1954，5月）.

7. Enteromorpha compressa (L.) Grev.　ヒラアオノリ
岡村1936, p.16; 東1936, p.1; 高松1939, p.22; 大島1950, p.6.
小泊（斎藤1955，7月）.

8. Ulva pertusa Kjellm.　アナアオサ
岡村1936, p.8; 東1936, p,1; 高松1939, p.24; 大島1950, p.4.
能生（斎藤1954，5月，9月），小泊（同'54，10月，'55，7月），百川（同'54，9月）.

Codiaceae ミル科

9. Codium fragile (Sur.) Hariot　ミル
岡村'36. p.123; 東'36, p.2; 高松'39. p.28; 大島'50, p.16.
能生（斎藤'54，9月；'55，7月）.

PHAEOPHYCEAE 褐藻綱

Sphacelariaceae クロガシラ科

10. Sphacelaria variabilis Sauv.　マタザキクロガシラ
岡村'36, p.152; 東'36, p.3; 高松'39, p.31; 大島'50, p.19.
能生（斎藤'55，7月），小泊（同'55，7月），百川（同'54，9月）.

Ectocarpaceae シオミドロ科

11. Ectocarpus sp.　シオミドロ一種

体は全長約1 cm，ホンダワラの葉に着生し，主軸は太さ20–50μ，細胞は直径の½から2倍の長さを有し，帯色体は小盤状。多くの枝を有し，枝の細胞は主軸に於けるより長く，直径の1–3倍あり，時には，殊に先端部では，4–6倍の長さに達し，その部には帯色帯が少ない。複子嚢は卵形で先端多少尖り，少しく内側に彎曲すること多く，長さ25–50μ，幅15–30μ，小枝の内側に並んで着き，無柄。単子嚢は未詳。

本種は欧米に産する ***Ectocarpus Sandrianus*** Zanard. によく似ているが，細胞が直径に比して長い点が

該種の記載と一致しない。もつと材料を集めて更に検討した上で種名を決定したいと思う。
小泊（斎藤 '54，9月）.

Leathesiaceae ネバリモ科

12. Leathesia difformis (L.) Aresch. ネ バ リ モ
岡村 '36, p.187; 東 '36, p.2; 高松 '39, p.34; 大島 '50, p.29.
能生（斎藤 '54，6月），小泊（同 '55，7月）.

Chordariaceae ナガマツモ科

⊙13. Sphaerotrichia divaricata Kylin f. typica Inagaki イ シ モ ヅ ク
稲垣 '54. p.11.
能生（稲垣 '54），小泊（斎藤 '55，6月，7月）.

※14. Chordaria flagelliformis (Müll.) Ag. ナ ガ マ ツ モ
岡村 '36, p.196; 大島 '50. p.31.
能生（岡村 '36）.

⊙15. Papenfussiella kuromo (Yendo) Inagaki ク ロ モ
Myriocladia Kuromo Yendo として，遠藤 '20, p.1; 岡村 '36, p.204; 東 '36, p.3; 高松 '39, p.36; 大島 '50, p.34.
能生（斎藤 '54，5月; '55，4月; 遠藤 '20）.

Acrothricaceae ニセモヅク科

16. Acrothrix pacifica Okamura et Yamada ニ セ モ ヅ ク
岡村 '36, p.206; 稲垣 '54, p.6.
小泊（斎藤 '55，6月）. ツルモに着生. 本州日本海沿岸新産種.

Fig. 1. ニセモヅク
ツルモに着生 ×1/2

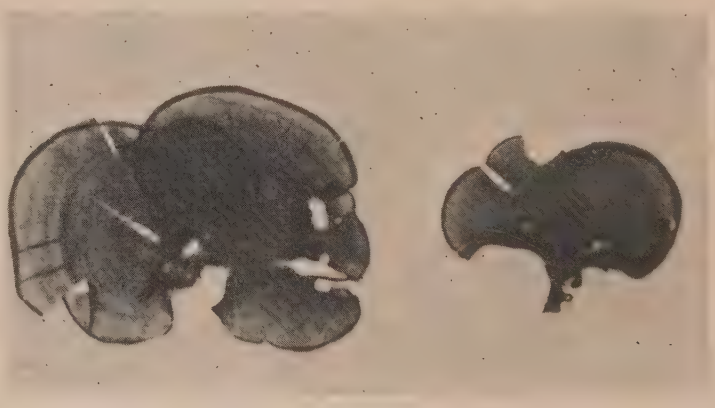


Fig. 2. オキナウテワ ×4/5

Spermatochnaceae モヅク科

17. Nemacystus decipiens (Sur.) Kuckuck モ ヅ ク
岡村 '36, p.208; 東 '36, p.3; 高松 '39, p.35; 大島 '50, p.34; 稲垣 '54, p.1.
小泊（斎藤 '55，7月）.

Punctariaceae ハバモドキ科

18. Punctaria latifolia Grev. ハ バ モ ド キ
岡村 '36, p.219; 東 '36, p.2; 高松 '39, p.37; 大島 '50, p.36.
能生（斎藤 '54，5月），小泊（同 '55，6月）.

Scytosiphonaceae カヤモノリ科

19. Scytosiphon lomentaria (Lyngb.) J. Ag. カ ヤ モ ノ リ
岡村 '36, p.227; 東 '36, p.2; 高松 '39, p.37; 大島 '50, p.38.
能生（斎藤 '54，4月，5月）.

20. Colpomenia sinuosa (Roth) Derb. et Sol. フクロノリ
岡村 '36, p.230; 東 '36, p.2; 高松 '39, p.38; 大島 '50, p.39.
能生（斎藤 '54, 5月; '55, 6月）.

21. Endarachne Binghamiae J. Ag. ハバノリ
岡村 '36, p.253; 東 '36, p.2; 高松 '39. p.39; 大島 '50, p.41.
能生（斎藤 '54, 5月, 11月; '55, 7月）.

22. Hydroclathrus clathratus (Bory) Howe カゴメノリ
岡村 '36, p.232; 高松 '39, p.39; 大島 '50, p.39. ***Hydroclathrus cancellatus*** Bory として, 東 '36, p.2.
小泊（斎藤 '55, 6月）.

Laminariaceae コンブ科

23. Chorda Filum (L.) Lamour. ツルモ
岡村 '36, p.243; 東 '36, p.3; 高松 '39, p.40; 大島 '50, p.43.
小泊（斎藤 '54, 6月; '55, 7月）.

※24. Ecklonia kurome Okamura クロメ
岡村 '36, p.271; 東 '36, p.3; 大島 '50, p.46.
能生（岡村 '36）.

25. Undaria pinnatifida (Harv.) Suring. ワカメ
岡村 '36, p.281; 東 '36, p.3; 高松 '39, p.40; 大島 '50, p.46.
能生（斎藤 '54, 4月, 5月）, 小泊（同 '55, 4月, 7月）.

Dictyotaceae アミヂグサ科

26. Dictyota dichotoma (Huds.) Lamour. アミヂグサ
岡村 '36, p.160; 東 '36, p.4; 高松 '39, p.31; 大島 '50, p.20.
能生（斎藤 '54, 5月, 9月）, 小泊（同 '55, 7月）.

※27. Dictyota linearis (Ag.) Grev. イトアミヂ
岡村 '36, p.162; 東 '36, p.4; 高松 '39, p.31; 大島 '50, p.21.
能生（岡村 '36）.

⊙28. Pachydictyon coriaceum (Holm.) Okamura サナダグサ
岡村 '36, p.165; 東 '36, p.4; 大島 '50, p.21.
能生（斎藤 '54, 5月; 岡村 '36）.

※29. Dilophus marginatus (non J. Ag.) Okamura フクリンアミヂ
岡村 '36, p.167; 東 '36, p.4; 大島 '50, p.22.
能生（岡村 '36）.

30. Dictyopteris undulata Holm. シワヤハズ
東 '36, p.4. ***Neurocarpus undulatus*** (Holm.) Okam. として, 岡村 '36, p.172; 高松 '39, p.32; 大島 '50, p.24.
小泊（斎藤 '55, 6月）.

⊙31. Dictyopteris prolifera (Okam.) Okamura ヘラヤハズ
東 '36, p.4. ***Neurocarpus prolifera*** (Okam.) Okamura として, 岡村 '36, p.174; 高松 '39, p.32; 大島 '50, p.25.
能生（斎藤 '54, 11月; 岡村 '36）; 小泊（斎藤 '55, 7月）.

32. Padina crassa Yamada コナウミウチワ
岡村 '36, p.183; 東 '36, p.3; 高松 '39, p.33; 大島 '50, p.27.
小泊（斎藤 '54, 9月, 10月）.

33. Padina japonica Yamada オキナウチワ
岡村 '36, p.184; 東 '36, p.3; 高松 '39, p.33; 大島 '50, p.28.
小泊（斎藤 '55, 6月）.

34. Myagropsis myagroides (Turn.) Fensholt ジョロモク
Cystophyllum sisymbrioides J. Ag. として, 岡村 '36, p.310; 東 '36, p.4; 高松 '39, p.41; 大島 '50, p.48.
小泊（斎藤 '54, 9月）.

Fig. 3. コナウミウチワ ×4/5

35. Sargassum piluliferum Ag. マメダワラ
岡村'36, p.321; 東'36, p.4; 高松'39, p.44; 大島, 50, p.51.
能生(斎藤'55, 7月).

※36. Sargassum patens Ag. ヤツマタモク
岡村'36, p.324; 東'36, p.4; 高松'39, p.44; 大島'50, p.50.
能生(岡村'36).

37. Sargassum Horneri Ag. アカモク
岡村'36, p.328; 東'36, p.4; 高松'39, p.43; 大島'50, p.56.
小泊(斎藤'55, 6月).

38. Sargassum tortile Ag. コレモク
岡村'36, p.330; 東'36, p.4; 高松'39, p.46; 大島'50, p.55.
能生(斎藤'55, 7月).

39. Sargassum confusum Ag. フシスジモク
岡村'36, p.335; 東'36, p.4; 高松'39, p.41; 大島'50, p.61.
小泊(斎藤'55, 6月, 7月).

40. Sargassum fulvellum (Turn.) Ag. ホンダワラ
Sargassum enerve Ag. として, 岡村'36, p.335; 東'36, p.4; 高松'39, p.42; 大島'50, p.53.
能生(斎藤'54, 5月).

41. Sargassum Thunbergii (Mert.) Kuntz. ウミトラノオ
岡村'36, p.337; 東'36, p.4; 高松'39, p.45; 大島'50, p.53.
能生(斎藤'54, 4月), 小泊(同'55, 7月), 百川(同'54, 9月).

42. Sargassum nipponicum Yendo タマナシモク
岡村'36, p.341; 東'36, p.4; 高松'39, p.43; 大島'50, p.58.
小泊(斎藤'54, 9月).

43. Sargassum hemiphyllum Ag. イソモク
岡村'36, p.342; 東'36, p.4; 高松'39, p.42; 大島'50, p.59.
能生（斎藤'54, 5月）.

44. Sargassum micracanthum (Kütz.) Yendo トゲモク
岡村'36, p.343; 東'36, p.4; 高松'39, p.43; 大島'50, p.57.
能生（斎藤'54, 10月, 11月）, 小泊（同'55, 6月）.

RHODOPHYCEAE 紅藻綱

Bangiaceae ウシケノリ科

45. Erythrotrichia reflexa (Crou.) Thuret ユミガタホシノオビ
田中'44, p.87.
小泊（斎藤'54, 9月）. カタノリの体上に *Rhodochorton Daviesii* と共に着生.

46. Bangia fusco-purpurea (Dillw.) Lyngb. ウシケノリ
岡村'36, p.377; 東'36, p.4; 高松'39, p.46; 大島'50, p.64.
能生（斎藤'54, 12月）, 小泊（同'55, 2月）.

47. Porphyra Okamurai Ueda クロノリ
岡村'36, p.381; 東'36, p.4; 高松'39, p.46; 大島'50, p.65.
能生（斎藤'54, 4月, 12月）, 小泊（同'55, 4月）.

48. Porphyra pseudolinearis Ueda ウップルイノリ
岡村'36, p.387; 東'36, p.5; 高松'39, p.48; 大島'50, p.67.
能生（斎藤'54, 11月）.

49. Porphyra tenera Kjellm. アサクサノリ
岡村'36, p.383; 東'36, p.5; 高松'39, p.47; 大島'50, p.66.
能生（斎藤'54, 11月）, 小泊（同'55, 2月）.

Chantransiaceae

50. Rhodochorton Daviesii (Dillw.) Drew ロドコルトン一種
中村'44, p.106.
能生（斎藤'54, 11月）, 小泊（同'54, 9月）, 百川（同'54, 9月）. ジャバラノリ, カタノリに着生. 日本海沿岸新産種.

Helminthocladiaceae

51. Nemalion vermiculare Sur. ウミゾウメン
岡村'36, p.413; 高松'39, p.48; 大島'50, p.69. *Nemalion helminthoides* として, 東'36, p.5.
能生（斎藤'54, 6月, 7月; '55, 7月）, 小泊（同'55, 6月）.

⊙52. Helminthocladia australis Harv. ベニモヅク
岡村'36, p.415; 東'36, p.5; 大島'50, p.70.
百川（斎藤'54, 9月）, 能生（岡村'36）.

Bonnemaisoniaceae カギノリ科

※53. Asparagopsis hamifera (Hariot) Okamura カギノリ
岡村'36, p.430; 東'36, p.5; 大島'50, p.71.
能生（岡村'36）.

Chaetangiaceae ガラガラ科

54. Galaxaura fastigiata Decne. ガラガラ
岡村'36, p.445; 東'36, p.5; 大島'50, p.72.
能生（斎藤'54, 11月）. 能生は本種の日本海沿岸分布北限と考えられる.

Gelidiaceae テングサ科

55. Gelidium Amansii Lamour. f. typicum Okamura マクサ
岡村'36, p.458, 460; 東'36, p.5; 高松'39, p.49; 大島'50, p.76.
能生（斎藤'54, 5月, 11月）.

56. Pterocladia tenuis Okamura オバクサ
岡村'36, p.467; 東'36, p.5; 高松'39, p.50; 大島'50, p.77.
能生（斎藤'54, 9月）.

Fig. 4. リボンイトグサ
スジムカデに着生 ×4/5

Fig. 5. ガラガラ ×1

Dumontiaceae リュウモンソウ科

⊙57. Hyalosiphonia caespitosa Okamura イソウメモドキ
岡村 '36, p.479; 東 '36, p.6; 高松 '39, p.51; 大島 '50, p.79.
能生（斎藤 '54, 5月, 10月; 岡村 '30).

Rhizophyllidaceae ナミノハナ科

※58. Chondrococcus japonicus (Harv.) Okamura ナミノハナ
岡村 '36, p.488; 東 '36, p.6; 大島 '50, p.81.
能生（岡村 '36).

Corallinaceae サンゴモ科

59. Lithophyllum Okamurai Fosl. f. japonica Fosl. ヒライボ
岡村 '36, p.512; 東 '36, p.6; 大島 '50, p.84.
小泊（斎藤 '55, 7月).

60. Amphiroa aberrans Yendo フサカニノテ
岡村 '36, p.520; 東 '36, p.6; 高松 '39, p.52; 大島 '50, p.86.
能生（斎藤 '54, 7月, 11月), 小泊（同 '54, 11月; '55, 7月).

※61. Amphiroa crassissima Yendo カニノテ一種
岡村 '36, p.521; 大島 '50, p.86.
能生（岡村 '36).

62. Corallina pilulifera Post. et Rupr. f. sororia Rupr. ピリヒバ一品種
岡村 '36, p.527; 東 '36, p.6; 高松 '39, p.52; 大島 '50, p.87.
能生（斎藤 '54, 4月, 6月, 11月), 小泊（同 '54, 10月; '55, 7月), 百川（同 '54, 9月).

63. Jania ungulata Yendo モサヅキ一種
岡村 '36, p.530; 東 '36, p.6; 大島 '50, p.89.
小泊（斎藤 '55, 6月).

※64. Jania arborescens Yendo モサヅキ一種
岡村 '36, p.531; 東 '36, p.6; 大島 '50, p.89.
能生（岡村 '36).

Grateloupiaceae ムカデノリ科

65. Halymenia acuminata (Holm.) J.Ag. オオムカデノリ
岡村 '36, p.535; 高松 '39, p.53.
能生（斎藤 '54, 4月, 5月).

66. Grateloupia filicina (Wulf.) Ag. ムカデノリ
岡村 '36, p.538; 東 '36, p.5; 高松 '39, p.54; 大島 '50, p.91.
能生（斎藤 '54, 4月, 5月; '55, 7月).

67. Grateloupia livida (Harv.) Yamada　　ヒラムカデ
岡村 '36, p.541; 高松 '39, p.55; 大島 '50, p.96.
能生（斎藤 '54, 11月; '55, 7月).

68. Grateloupia divaricata Okamura　　カタノリ
岡村 '36, p.541; 東 '36, p.5; 高松 '39, p.53; 大島 '50, p.92.
能生（斎藤 '54, 9月; '55, 7月), 小泊（同 '54, 9月), 百川（同 '54, 9月).

69. Grateloupia ramosissima Okamura　　スジムカデ
岡村 '36, p.542; 高松 '39, p.55.
小泊（斎藤 '54, 9月).

70. Grateloupia Okamurai Yamada　　キョウノヒモ
Grateloupia lancifolia として, 岡村 '36, p.542; 東 '36, p.6; 高松 '39, p.55; 大島 '50, p.93.
能生（斎藤 '55, 7月).

※71. Grateloupia imbricata Holm. f. flabellata Okamura　　サクラノリ
岡村 '36, p.543; 東 '36, p.5; 高松 '39, p.54; 大島 '50, p.94.
能生（岡村 '36).

72. Pachymeniopsis elliptica (Holm.) Yamada　　タンバノリ
Grateloupia elliptica として, 岡村 '36, p.543; 東 '36, p.6; 高松 '39, p.53; 大島 '50, p.95.
能生（斎藤 '54, 4月, 5月, 6月).

73. Pachymeniopsis Yendoi Yamada　　アカハダ
Pachymenia carnosa として, 岡村 '36, p.545.
能生（斎藤 '54, 5月, 7月).

74. Carpopeltis affinis (Harv.) Okamura　　マツノリ
岡村 '36, p.553; 東 '36, p.6; 高松 '39, p.56; 大島 '50, p.97.
小泊（斎藤 '54, 5月).

Endocladiaceae　フノリ科

75. Gloiopeltis furcata (Post. et Rupr.) J. Ag.　　フクロフノリ
岡村 '36, p.562; 東 '36, p.5; 大島 '50, p.99.
小泊（斎藤 '55, 6月).

Hypneaceae　イバラノリ科

76. Hypnea chordacea Kütz.　　ヒモイバラ
田中 '41, p.230.
小泊（斎藤 '55, 6月). 本州新産種.

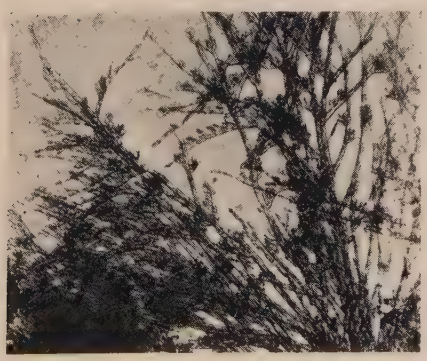


Fig. 6.　ロドコルトン1種　×56

Fig. 7.　ヒモイバラ　×4/5

77. Hypnea flagelliformis Grev.　　スジイバラノリ
東 '36, p.8; 田中 '41, p.232; 大島 '50, p.103.
能生（斎藤 '54, 11月), 小泊（同 '54, 10月), 百川（同 '54, 9月).

78. Hypnea japonica Tanaka　　カギイバラノリ
田中 '41, p.236; 大島 '50, p.105. ***Hypnea musciformis*** として, 岡村 '36, p.609.
小泊（斎藤 '54, 5月).

79. Hypnea charoides Lamour. イバラノリ
田中 '41, p.243; 大島 '50, p.104. ***Hypnea seticulosa*** として, 岡村 '36, p.611; 東 '36, p.8; 高松 '39, p.58.
能生（斎藤 '55, 7月), 小泊（同 '54, 9月, 10月; '55, 7月). ウミトラノオその他の海藻に着生.

80. Hypnea nidulans Setch. ムラサキコケイバラ
岡村 '36, p.609; 田中 '41, p.246.
小泊（斎藤 '55, 7月). 本州日本海沿岸新産種.

Sphaerococcaceae タマミ科

81. Caulacanthus Okamurai Yamada イソダンツウ
岡村 '36, p.620; 東 '36, p.5; 大島 '50, p.108.
能生（斎藤 '55, 6月).

Gracilariaceae オゴノリ科

82. Gracilaria verrucosa (Huds.) Papenf. オゴノリ
Gracilaria confervoides として, 岡村 '36, p.628; 東 '36, p.8; 高松 '39, p.60; 大島 '50, p.109.
小泊（斎藤 '54, 9月, 10月; '55, 7月)。

※83. Gracilaria bursa-pastoris (Gmel.) Silva シラモ
Gracilaria compressa として, 岡村 '36, p.630; 東 '36, p,8; 高松 '39, p.59; 大島 '50. p.110.
能生（岡村 '36).

84. Gracilaria Textorii (Sur.) J. Ag. カバノリ
岡村 '36, p,632; 東 '36, p.8; 高松 '39, p.60; 大島 '50, p.110.
能生（斎藤 '55, 7月).

Phyllophoraceae オキツノリ科

85. Gymnogongrus flabelliformis Harv. オキツノリ
岡村 '36, p.643; 東 '36, p.7; 高松 '39, p.61; 大島 '50, p.111.
能生（斎藤 '54, 5月).

Gigartinaceae スギノリ科

86. Chondrus ocellatus Holm. f. typicus Okamura ツノマタ
岡村 '36, p.653, 655; 東 '36, p.7; 高松 '39, p.64; 大島 '50, p.114.
能生（斎藤 '54, 5月).

f. crispus Okamura トチャカ
岡村 '36, p.656; 東 '36, p.7; 高松 '39, p.64; 大島 '50, p.114.
能生（斎藤 '54, 5月).

f. nipponicus Okamura マルバツノマタ
岡村 '36, p.656. ***Chondrus nipponicus*** として, 遠藤 '20, p.4.
能生（斎藤 '54, 5月, 9月).

87. Chondrus armauts (Harv.) Okamura トゲツノマタ
岡村 '36, p.657; 東 '36, p.7; 高松 '39, p.63.
能生（斎藤 '54, 11月), 小泊（同 '54, 9月).

88. Gigartina tenella Harv. スギノリ
岡村 '36, p.650; 東 '36, p.7; 高松 '39, p.62; 大島 '50, p.112.
能生（斎藤 '54, 5月), 小泊（同 '54, 9月).

Rhodymeniaceae ダルス科

89. Chrysymenia Wrightii (Harv.) Yamada オオタオヤギソウ
岡村 '36, p,667; 東 '36, p.7; 高松 '39, p,65; 大島 '50, p.115.
小泊（斎藤 '55, 6月).

※90. Rhodymenia intricata (Okam.) Okamura マサゴシバリ
岡村 '36, p.677; 東 '36, p.7; 高松 '39, p.66; 大島 '50, p.116.
能生（岡村 '36).

Champiaceae ワツナギソウ科

91. Lomentaria catenata Harv. フシツナギ
岡村 '36, p.682; 東 '36, p.7; 高松 '39, p.66; 大島 '50, p.117.

能生（斎藤’54，9月）.

92. Champia parvula (Ag.) J. Ag. ワツナギソウ
岡村’36，p.686; 東’36，p.7; 高松’39，p.67; 大島’50，p.118.
百川（斎藤’54，9月）.

Ceramiaceae イギス科

93. Callithamnion corymbosum Lyngb. キヌイトグサ一種
岡村’36，p.702.
能生（斎藤’54，5月）。オオムカデノリに着生．本州日本海沿岸新産種.

94. Callithmnion callophyllidicola Yamada キヌイトグサ
岡村’36，p.703.
能生（斎藤’54，11月）．トゲツノマタに着生．本州日本海沿岸新産種.

⊙95. Crouania attenuata (Bonnem.) J. Ag. ヨツノサデ
岡村’36，p.710; 東’36，p.8; 大島’50，p.122.
小泊（斎藤’55，6月）．トゲモクに着生．能生（岡村’36）.

⊙96. Wrangelia argus Mont. ラングリア
岡村’36，p.712; 東’36，p.8; 大島’50，p.123.
小泊（斎藤’55，7月），能生（岡村’36）.

97. Griffithsia tenuis Ag. ケカザシグサ
岡村’36，p.719; 東’36，p.8; 大島’50，p.125.
百川（斎藤’54，9月）．石灰藻に着生.

⊙98. Spyridia filamentosa (Wulf.) Harv. ウプゲグサ
岡村’36，p.733; 東’36，p.8; 高松’39，p.68; 大島’50，p.126.
小泊（斎藤’55，7月），能生（岡村’36）.

99. Ceramium tenerrimum (Mart.) Okamura ケイギス
岡村’36．p.736; 東’36，p.8; 高松’39，p.70; 大島’50，p.127.
小泊（斎藤’55，7月）.

⊙100. Ceramium Kondoi Yendo イギス
遠藤’20，p.9; 中村’50，p.160.
能生（遠藤’20）.
f. typicum Nakamura
中村’50，p.163.
小泊（斎藤’54，5月）．浜に打揚げられたもの.
f. abbreviatum Nakamura
中村’50，p.164.
能生（斎藤’54，5月）．岩に生じたもの.
f. trichotomum Nakamura
中村’50，p. 164.
能生（斎藤’54，5月）．浜に打揚げられたもの.

※101. Ceramium japonicum Okamura ハネイギス
岡村’36，p. 742; 東’36，p.8; 高松’39，p.69; 大島’50，p.130.
能生（岡村’36）.

※102. Campylaephora crassa (Okam.) Nakamura f. elongata Nakamura フトイギス一品種
中村’50，p 169. ***Ceramium secundatum*** として，遠藤’18，p.79.
能生（遠藤’18; 中村’50）.

103. Campylaephora hypnaeoides J. Ag. エゴノリ
中村’50，p.170. ***Ceramium hypnaeoides*** として，岡村’36，p.740; 東’36，p.8; 高松’39，p.69; 大島’50，p.129.
小泊（斎藤’54，5月）.

104. Centroceras clavulatum (Ag.) Mont. トゲイギス
岡村’36，p.743; 東’36，p.8; 高松’39，p.71; 大島’50，p.131.
小泊（斎藤’55，7月）.

⊙105. Microcladia dentata Okamura コスジサエダ
岡村 '36, p.745.
小泊（斎藤 '54, 5月), 越後藤崎（岡村 '36). 藤崎は百川の近接地.

Dasyaceae ダジア科

※106. Heterosiphonia pulchra (Okam.) Falkenb. シマダジア
岡村 '36, p.798; 東 '36, p.9; 高松 '39, p.73; 大島 '50, p.186.
能生（岡村 '36).

⊙107. Heterosiphonia japonica Yendo イソハギ
岡村 '36, p.799; 東 '36, p.9; 大島 '50, p.135.
f. nipponica Yendo
遠藤 '20, p.8.
小泊（斎藤 '55, 6月), 能生（遠藤 '20).

※108. Dasya elongata Sond. ダジア一種
遠藤 '18, p.71; 東 '36, p.9; 高松 '39, p.72.
能生（遠藤 '18).

Delesseriaceae コノハノリ科

109. Acrosorium Yendoi Yamada ハイウスバノリ
岡村 '36, p.786; 東 '36, p.8; 高松 '39, p.71; 大島 '50, p. 134.
能生（斎藤 '55, 7月), 小泊（同 '54, 9月), 百川（同 '54, 9月). ホンダワラ類その他の海藻に着生.

Rhodomelaceae フジマツモ科

110. Laurencia intermedia Yamada クロソゾ
山田・'31, p.181; 東 '33, p.9; 大島 '50, p.147.
百川（斎藤 '54, 9月).

111. Laurencia venusta Yamada ヒメソゾ
山田 '31, p.203; 岡村 '36, p.855; 高松 '39, p.76.
小泊（斎藤 '55, 7月).

112. Laurencia japonica Yamada オモテソゾ
山田 '31, p.211; 岡村 '36, p.855; 高松 '39, p.75.
能生（斎藤 '54, 9月), 小泊（同 '55, 7月).

⊙113. Laurencia nipponica Yamada ウラソゾ
山田 '31, p. 209; 岡村 '36, p.855; 東 '36, p.8; 高松 '39, p.75; 大島 '50, p.148.
能生（斎藤 '54, 5月; 山田 '31).

114. Laurencia Okamurai Yamada ミツデソゾ
山田 '31, p.206; 岡村 '36, p.856; 東 '36, p.9; 高松 '39, p.76; 大島 '50, p.150.
小泊（斎藤 '55, 6月).

115. Laurencia composita Yamada キクソゾ
山田 '31, p.236; 岡村 '36, p.856.
能生（斎藤 '54, 5月).

116. Laurencia glandulifera Kütz. オオソゾ
山田 '31, p.218; 岡村 '36, p.858; 大島 '50, p.149.
能生（斎藤 '54, 5月).

⊙117. Laurencia hamata Yamada カギソゾ
岡村 '36, p.859; 東 '36, p.8; 高松 '39, p.75; 大島 '50, p.149.
小泊（斎藤 '55, 7月), 能生（岡村 '36).

118. Laurencia pinnata Yamada ハネソゾ
山田 '31, p.242; 岡村 '36, p.859; 東 '36, p.9; 大島 '50, p.149.
能生（斎藤 '54, 6月), 小泊（同 '55, 7月).

※119. Chondria tenuissima (Good. et Woodw.) Ag. ホソヤナギノリ
岡村 '36, p.842; 高松 '39, p.74; 大島 '50, p.143.
能生（岡村 '36).

※120. Chondria dasyphylla (Woodw.) Ag.　ヤナギノリ
岡村'36, p.843; 東'36, p.9; 高松'39, p.74; 大島'50, p.144.
能生（岡村'36）.

121. Chondria crassicaulis Harv.　ユナ
岡村'36, p.844; 東'36, p.9; 高松'39, p.73; 大島'50, p.144.
小泊（斎藤'54, 9月）.

※122. Chondria expansa Okamura　モサヤナギ
岡村'36, p.846; 東'36, p.9; 大島'50, p.145.
能生（岡村'36）.

※123. Polysiphonia scopulorum Harv.　オワリイトグサ
瀬木'51, p.200. ***Polysiphonia ferulacea*** として, 遠藤'18, p.75.
能生（瀬木'51）.

124. Polysiphonia decumbens Segi　リボンイトグサ
瀬木'51, p.218.
小泊（斎藤'54, 9月）. スジムカデに着生. 本種は出雲三保関で瀬木博士が発見命名された種類.

125. Polysiphonia japonica Harv.　キブリイトグサ
岡村'36, p.830; 東'36, p.9; 高松'39, p.73; 大島'50, p.140; 瀬木'51. p.228.
小泊（斎藤'54, 5月）. 岩上, 又はツノマタその他の海藻に着生.

126. Polysiphonia urceolata (Dillw.) Grev.　ショウジョウケノリ
岡村'36. p.824; 東'36, p.9; 大島'50, p.142; 瀬木'51, p.239.
能生（斎藤'54, 5月）. 岩の上に生ずる.

127. Polysiphonia Morrowii Harv.　モロイトグサ
岡村'36, p.826; 東'36, p.9; 高松'39, p.72; 大島'50, p.141; 瀬木'51,p.244.
能生（斎藤'54, 5月）. 岩の上に生ずる.

128. Symphyocladia marchantioides (Harv.) Falkenb.　コザネモ
岡村'36, p.865; 東'36, p.9; 大島'50, p.151.
小泊（斎藤'54, 5月）.

◉129. Symphyocladia linearis (Okam.) Falkenb.　ホソコザネモ
岡村'36, p.866; 大島'50, p.153.
小泊（斎藤'55, 6月）, 能生（岡村'36）.

◉130. Symphyocladia pennata Okamura　ヒメコザネ
岡村'36, p.867; 東'36, p.9; 大島'50, p.152. ***Pterosiphonia parasitica*** として, 遠藤'18, p.265.
能生（斎藤'54, 11月; 遠藤'18）.

131. Symphyocladia latiuscula (Harv.) Yamada　イソムラサキ
Symphyocladia gracilis として, 岡村'36, p.868; 東'36, p.9; 高松'39, p.77; 大島'50, p.152.
能生（斎藤'54, 5月, 10月）, 小泊（同'55, 7月）.

132. Herposiphonia insidiosa (Grev.) Falkenb.　カギヒメゴケ
岡村'36, p.871.
百川（斎藤'54, 9月）.

133. Herposiphonia fissidentoides (Holm.) Okamura　ヒメゴケ
岡村'36, p.872; 東'36, p.9; 大島'50, p.157.
能生（斎藤'54, 11月）.

◉134. Euzoniella flaccida (Harv.) Falkenb.　クシノハ
岡村'36, p.876; 東'36, p.9; 大島'50, p.155.
能生（斎藤'54, 11月；岡村'36）. フサカニノテに着生.

135. Leveillea jungermannioides (Mart. et Her.) Harv.　ジャバラノリ
岡村'36, p.878; 東'36, p.9; 高松'39, p.77; 大島'50, p.156.
能生（斎藤'54, 11月）, 小泊（同'55, 6月）. ホンダワラその他の海藻に着生.

Corallinaceae サンゴモ科 (追加)

※136. Corallina squamata Ellis et Sol. サ ン ゴ モ 一 種
岡村 '36, p.528.
能生 (岡村 '36).

引 用 文 献

東 道太郎 (1936). 日本海 (本州沿岸) 産海藻目録。水産研究誌, 31 (5) : 290-298.

Inagaki, K. (稲垣貫一) (1954). Contributions to the Knowledge of the Chordariales from Japan, I. *Sci. Pap. Inst. Algol. Res., Fac. Sci. Hokk. Univ.*, 4 (1): 1-14, figs. 1-10.

Nakamura, Y. (中村義輝) (1950). New Ceramiums and Campylaephoras from Japan. *Sci. Pap. Inst. Algol. Res., Fac. Sci. Hokk. Univ.*, 3 (2): 155-172, figs. 1-7.

岡村金太郎 (1936). 日本海藻誌。

大島勝太郎 (1950). 富山湾海藻誌。

Segi, T. (瀬木紀男) (1951). Systematic Study of the Genus Polysiphonia from Japan and its Vicinity. *Jour. Fac. Fish., Mie Pref. Univ.*, 1 (2): 167-272, Pls. 1-16, 36 text-figs.

Takamatsu, M. (高松正彦) (1939). Marine Algae from the Coast of Japan Sea in Northeastern Honshu, Japan. *Saito Ho-on Kai Mus. Res. Bull.*, No. 17, Bot., no. 6: 21-83, pls. 5-13, 1 text-fig.

Tanaka, T. (田中 剛) (1941). The Genus Hypnea from Japan. *Sci. Pap. Inst. Algol. Res., Fac. Sci., Hokk. Imp. Univ.*, 2 (2): 227-250, pls. 53-54, 21 text-figs,

Yamada, Y. (山田幸男) (1931). Notes on Laurencia, with Special Reference to the Japanese Species. *Univ. Calif. Publ. Bot.*, 16 (7): 185-310, pls. 1-30, 20 text-figs.

———— (1932). Notes on Some Japanese Algae, IV. *Jour. Fac. Sci., Hokk. Imp. Univ., Ser.* V, 2 (2): 267-276, pls. 3-9, 3 text-figs.

Yamada, Y. & Segawa, S. (瀬川宗吉) (1953). On some new or noteworthy algae from Hachijo Island. *Rec. Oceanog. Works in Japan*, 1 (1): 109-114, 7 text-figs.

Yendo, K. (遠藤吉三郎) (1909-1918). Notes on Algae New to Japan, I-VIII & Concluding Remark. *Bot. Mag., Tokyo*, 23 (270) - 32 (380).

———— (1920). Novae Algae Japoniae Decas I-III. *Bot. Mag., Tokyo*, 34 (397): 1-12.

塩辛の細菌学的研究

第14報　細菌のL-アミノ酸酸化酵素系の相互転化について *

故　長　尾　　清
（北海道大学水産学部水産細菌学教室）

Bacteriological Studies of Shiokara or "Soused Squid"

14. On the mutual transformation of L-amino acid oxidizing enzymes in the isolated bacteria

Late Kiyoshi NAGAO

緒　　言

酵素の研究は周知の様に主として1930年以後生細胞からの抽出精製によつてその実体が解明され，酸化還元系の様に，試験管内で数種の酵素を連結して，再合成的に観察され得るようになつたものや，或は1940年前後から明らかにされた如く，高エネルギー含有の燐酸化合物の存在下に，合成反応を試験管内で部分的に再現出来るようになつたものもある。これらの成果は酵素の単離から一歩進んで，生細胞内の酵素相互間の連関に近づいたことを示している。

著者は前に塩辛の熟成中の呈味の源と考えられるアミノ酸が生細胞の内外でどの様にして生合成され或は代謝されて行くかと云う問題特に Braunstein 等が提唱したアミノ酸の酸化的脱アミノとアミノ基転移との系について，実際にどのアミノ酸がどの程度にこの機序で酸化されるかを研究し，併せてアミノ酸酸化酵素の形成と云う問題について解析を試みた。

適応酵素が形成される場合，重要な現象は加えられた基質によりそれぞれ特有な lag phase を経過して後酵素が実際に合成され，基質が存在する限り一定の活性を維持する lag phase が見られる事である。本報に於ては未適応菌にA，B，C……等の基質を同時に与えた場合，同時にすべての基質に対して酵素系が形成されるか否か，酵素形成の時アミノ酸相互間に拮抗作用があるか否か，又一度 lag phase を経て形成された酵素系の相互転化の問題について研究した結果について報告する。

実　験　方　法

使用菌種・培養法・菌浮游液の調製法・酸化能の測定方法は前報に記載した通りである。

実験結果及び考察

1　二種のアミノ酸混液中に於ける酸化能

著者は前に各種アミノ酸の混合物を加えた培地で発育させた菌は agar-agar 培地に発育した菌に比しアミノ酸の酸化能は弱く，酵素形成の為の lag phase がやゝ長くなる事を報告した。

Neurospora crassa の場合でもカゼイン加水分解物を培地中に加えるとL-アミノ酸酸化酵素の形成は阻止される。これらの事実は発育時培地中の基質の濃度や基質相互間の拮抗作用及び単一の基質がある時にのみその基質に特異的な酵素が形成される等の理由によるものであろうと思われる。

---

* 本論文は故長尾清氏の遺稿であつて，木村喬久氏これを整理し，谷川英一氏の校閲を経て出版の運びとなつたものである。（編集委員）

Spiegelman は amino acid analogue を用いて，酵母に於ける酵素形成について実験し酵素蛋白合成は遊離のアミノ酸を primary nitrogen source として用いられる事を明らかにした。この場合 L-glutamic-γ-hydrazide が単に glutamic acid の analogue として作用し，glutamic acid の蛋白への高分子化（incorporation）を阻害するのみでなく，適応の lag の段階で L-glutamic-γ-hydrazide はアミノ基転移反応の阻害剤として作用し，酵素蛋白の素材アミノ酸の質的量的集約がおさえられる。それで細胞に基質が与えられて，まず諸アミノ酸の集約化が起り，これらが蛋白へ高分子化される段階で，唯一つのアミノ酸の利用が阻害されると例えば唯一つのアミノ酸の analogue の添加等ですべてのアミノ酸の高分子化された物質の形成を意味するものと考えられる。

以上の点及びアミノ酸の種類によつて酸化される速度に差がある事やアミノ酸酸化酵素と基質との結

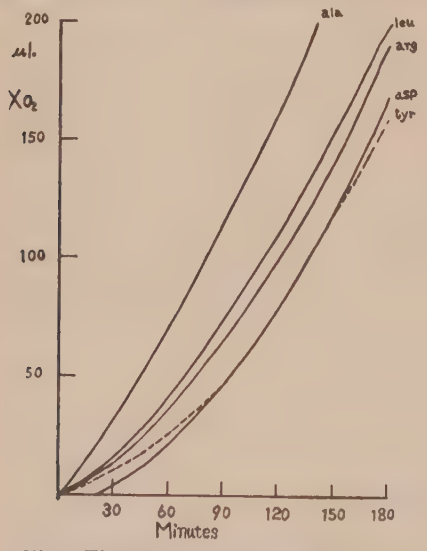


Fig. 1 The effects of the presence of the other amino acids on the oxidation of glutamic acid by cell suspensions of *Bac. subtilis*
Each manometric cup contained 1cc of bacterial suspension (2mg dry weight /cc), 0.5cc of 2.5×10^{-2}M glutamic acid, 0.5cc of 2.5×10^{-2}M amino acid, and 0.5cc of 0.067M phosphate buffer of pH 7.4; 0.3cc of alkali in center well.

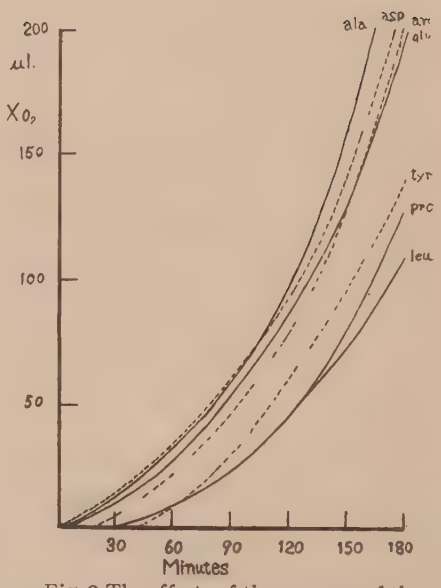


Fig. 2 The effects of the presence of the other amino acids on the oxidation of proline by cell suspensions of *Bac. subtilis*
The experimental conditions are the same in Fig. 1.

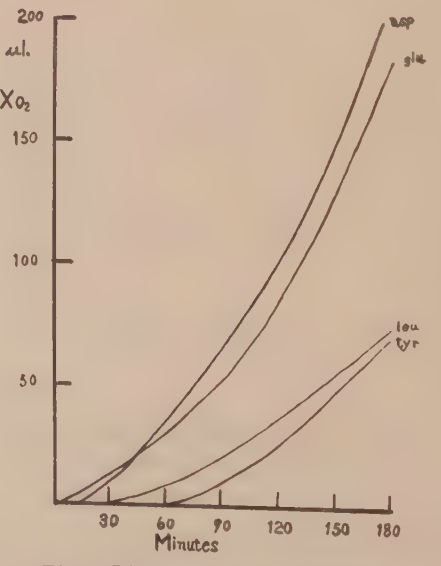


Fig. 3 The effects of the presence of the other amino acids on the oxidation of arginine by cell suspensions of *Bac. subtilis*
The experimental conditions are the same as in Fig. 1.

合等の事を考えるとアミノ酸相互間の拮抗作用が起り得るのではないかと云う事が考えられる。

Bac. subtilis を agar-agar 培地に培養し，常法通り菌浮遊液を作り glutamic acid とそれ以外のアミノ酸の混液，proline とそれ以外のアミノ酸混液，arginine とそれ以外のアミノ酸の混液を基質とした場合の酸化能を測定した結果をFig. 1，2及び3に図示した。

Fig. 1に示した様に glutamic acid + alanine の場合は glutamic acid 単独及び alanine 単独の場合より酵素活性及び酸化酵素形成量は大である。Glutamic acid と alanine 以外のアミノ酸の共存の場合は glutamic acid 単独の場合に比し僅かに酸化能は低下しているが，殆んど差がない。これは酸化され難い leucine, arginine 及び tyrosine と共存していても glutamic acid に対する酸化能には余り影響しない事を示している。 Aspartic acid 単独の場合，この菌の浮游液では最も速かに酸化されるにも拘らず glutamic acid + aspartic acid の 場合はそれぞれのアミノ酸の単独の場合に比し活性は低下し約20分の Lag phase を要した。

Fig. 2に示した様に proline とそれ以外のアミノ酸の共存の場合はこれらのアミノ酸の単独の場合とあまり差がない。但し proline + arginine の場合に proline 単独及び arginine 単独の場合に比し酸化能は大となつているが，これはいかなる理由によるか不明である。

Fig. 3に示した様に arginine とそれ以外のアミノ酸の共存の場合も，それぞれのアミノ酸単独の場合とあまり差がない。

2 酵素系の相互転化

Bac. subtilis の菌体を或るアミノ酸と接触させ，そのアミノ酸の酸化に適応した菌を作り，この菌を水洗して適応菌の浮游液を作り，この菌に他のアミノ酸を反応させた場合の酸化能を測定した結果を Fig. 4, 5, 6及び7に図示した。

1） Glutamic acid 適応菌の場合

Glutamic acid に対する酸化酵素量は増大し，反応と同時に旺盛な酸素消費が見られる。 Glutamic acid

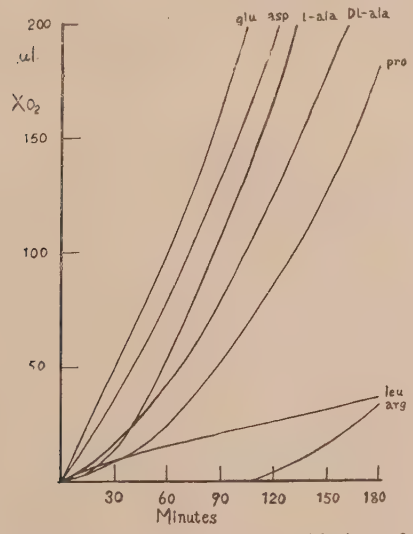


Fig. 4 The velocity of oxidation of amino acids by the cells adapted with glutamic acid
The cells adapted with glutamic acid were prepared by the incubation of glutamate with intact cells at 30° for 100 min., then the cells were washed with distilied water.

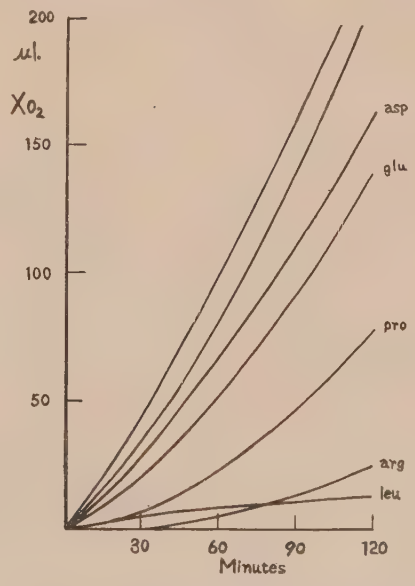


Fig. 5 The veloicity of oxidation of amino acids by the cells adapted with DL-alanine

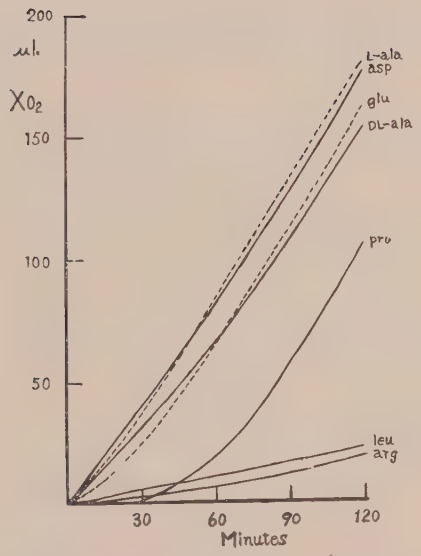


Fig.6 The velocity of oxidation of amino acids by the cells adapted with L-aspartic acid

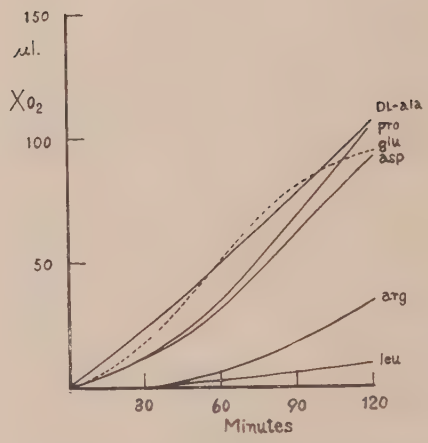


Fig.7 The velocity of oxidation of amino acids by the cells adapted with L-proline

以外のアミノ酸に対しては Glutamic acid 未適応菌の場合と同様に L-aspartic acid, L-alanine, L-proline 及び L-leucine の順序で酸化される。しかしこれらのアミノ酸に対する酸化能は増大している。 Arginine に対する酸化は全然見られず約100分の lag phase 後に酸化作用が見られる、この場合未適応菌の場合より lag phase は約40分延長されている。

2) DL-Alanine 適応菌の場合

DL-alanine, L-alanine, L-aspartic acid, L-glutamic acid L-proline, 及び L-leucine の順序で酸化され DL-alanine, L-alanine, L-aspartic acid 及び L-glutamic acid に対する酸化酵素量は増大している。 L-proline 及び L-leucine に対しては酵素量の増大は見られない。L-arginine に対しては未適応菌の場合と同様約40分の lag phase の後酸素の消費が見られ，しかも酵素形成量も未適応菌と変らない。

3) L-aspartic acid 適応菌の場合

L-aspartic acid, L-alanine, DL-alanine, L-glutamic acid, L-leucine 及び L-arginine の順序で酸化され，L-aspartic acid, L-alanine 及び DL-alanine に対する酵素量は未適応菌より増大している。L-leucine に対する酸化能は未適応菌と変らない。L-arginine に対しては微弱だから lag phase なしに酸素の消費が見られる。

4) L-proline 適応菌の場合

L-proline に対する酸化酵素量は未適応菌よりやゝ増大しているに過ぎない。これは L-proline との接触時間が短かく充分に適応し得なかつた為であろう。然し DL-alanine, L-glutamic acid, L-aspartic acid 及び L-leucine に対する酵素量は著しく抑制され，L-leucine に対しては約 40分の lag phase を要する。 L-arginine に対する酸化は未適応菌と変らない。

要 約

1. 基質が二種のアミノ酸の混合液である場合，単一のアミノ酸が酸化される場合と差がなく，アミノ酸相互間の拮抗作用は現われない。

2. 一つのアミノ酸と接触させ，そのアミノ酸に適応した菌に依る他のアミノ酸の酸化能は未適応菌と差がない。

BACTERIOLOGICAL STUDY OF SHIOKARA OR "SOUSED SQUID" GENERAL DISCUSSION*

LATE Kiyoshi NAGAO
Faculty of Fisheries, Hokkaido University

The ripening of Shiokara has hitherto been ascribed to enzymatic and bacterial action. Some studies have been reported on the chemical changes during the ripening process of Shiokara, and on the presence of certain autolytic enzymes which are concerned in it, but no investigation has ever been made on the ripening of Shiokara from the view point of bacterial metabolism.

The manifold chemical activities of bacteria are catalysed by enzyme formed within the bacterial cells. Some bacterial species can exist under widely different chemical and physical environments; they require different types of enzymes in order to deal with the different external conditions, and they can maintain themselves in dynamic equilibrium with their environment. Shiokara contains much sodium chloride in solution.

In such an environment, bacteria require different types of enzymes in order to deal with such external conditions.

In this paper, the author wishes to throw light on the phenomena of ripening of Shiokara by studying it from the view point of bacterial metabolism.

1. In the early stage, the ripening of Shiokara was found to be mainly due to the autolyzing enzymes. The ripening by bacterial action was found to have begun after 20 days fermentation.

2. The Shiokara was extracted with water and then the extracted substance was separated into several kinds of nitrogen fraction. Each fraction of nitrogen was measured. The percentage of the nitrogen in the combined forms to the nitrogen in the extracted material was determined. Also the percentage of the different forms of nitrogen to the non-protein nitrogen was determined. The experimental results were as follows:

1) The percentage of the non-protein nitrogen to the total nitrogen in the extracted materials was, 55.8 per cent at the first day, 68.5 per cent at 9 days old. From 9 to 20 days later this percentage was almost constant. After 20 days of fermentation this percentage was increased and at 33 days later amounted to 79.3 per cent.

2) The percentage of amino-nitrogen in monoamino fraction to the total nitrogen in monoamino fraction was, 34.8 per cent at the first day. From 0 to 12 days later this percentage was increased logarithmically. At 33 days later this percentage amounted to 68.1 per cent. It is considered that monoamino acid is the primary chemical compoment related to the taste of Shiokara.

* The manuscripts left by the late Mr. K. Nagao are published in the form of this paper after arrangement by Mr. T. Kimura and revision by Dr. E. Tanikawa. (Editorial staff)

3. The phenomenon of ripening of Shiokara under several conditions was observed by determining the amount of amino-nitrogen and free amino acids. Experimental conditions were as follows:

Sample 1. Filled with H_2 an air-tight vessel, which had been half filled with Shiokara.

Sample 2. Filled with H_2 another air-tight vessel, which had been half filled with Shiokara, mixed with toluene.

Sample 3. Blow air into Shiokara, half filled in an open vessel.

Sample 4. Mixed toluene in Shiokara, which half filled a covered vessel.

Sample 5. Kept in natural condition in an open vessel (control sample).

From 0 to about 10 days later the amount of amino-nitrogen increased rapidly in every sample. This was mainly due to the action of autolyzing enzymes. After 20 days of fermentation the amount of amino nitrogen increased again in Sample 3. This was mainly due to the action of bacterial enzymes.

In the early stage, free amino acids such as aspartic acid, glutamic acid, glycine, alanine, valine, leucine, phenylalanine, tyrosine, arginine, lysine, histidine, proline, serine, threonine and ornithine were detected in Shiokara by means of paper chromatographic method. Free tyrosine, arginine and lysine in Samples 1 and 2 disappear during ripening process. Free histidine in Samples 3,4 and 5 disappear during its ripening process. Oxyproline was detected in every sample at the later stage of ripening.

4. Many halophilic or halotolerant bacteria were isolated aerobically from Shiokara. Eight species were identified as follows:

Bacillus subtilis, *Bacillus subtilis* sp. (*Bac. mesentericus fuscus*), *Bacillus cereus* var. *mycoides*, *Micrococcus flavus*, *Micrococcus perflavus*, *Micrococcus freudenreichii*, *Micrococcus subflavescens*, *Lactobacillus* sp.

Two species of facultative anaerobes were identified but none of strict anaerobe was isolated.

5. A study was made of the difference in the numbers of bacteria found in Shiokara which was manufactured by using hot air sterilized salt and non-sterilized salt. The results obtained were as follows:

1) The maximum number of colonies on the plate agar-agar containing 5, 10, 15 and 20 per cent of sodium chloride respectively at 35° and 25° was obtained after 3 days. This is supposed to be due to the use of vessel of 70% moisture in which 33% sulphuric acid was put, for the cultivation of bacteria in Shiokara.

2) The results of the comparison of use of hot air sterilized salt and non sterilized salt for the ripening of Shiokara, show that the number of bacilli present in raw material influenced the growth of bacilli in the Shiokara, although the initial growth of bacilli was slowed by the addition of the salt.

6. From the observations on the relation between ripening and the number of bacilli, the ripening by bacterial action was found to have taken place after 20 days of fermentation.

7. He prepared a proteolytic enzyme of *Bac. subtilis* which was isolated from Shiokara, by using either lysis, lyophilization, or treatment with acetone and ether. The enzyme showed optimal activity at pH 6.8 to 7.2 and temperature of 40°. It is of interest that the enzyme was not much affected by the presence of a high concentration of sodium chloride. The proteolytic activity of an enzyme prepared by acetone-ether treatment was nearly the same as that prepared by lyophilization, whereas that of an enzyme prepared by lysis was lower than the others.

8. A proteolytic enzyme of *Bac. subtilis* was prepared by treatment with acetone and ether.

1) This enzyme was activated by Mn^{++}, Co^{++} and Zn^{++}. It was not activated by Mg^{++}.

2) When Mn^{++}, Co^{++} or Zn^{++} was added at the start of hydrolysis, a definite lag phase was observed before the first order reaction took place. When the enzyme was treated, however, with Mn^{++}, Co^{++} or Zn^{++} at 37° for three hours before the substrate was added, the hydrolysis took place according to the first order reaction without any lag phase. The metal does not act simply as an activator of the enzyme but appears to be chemically combined with the protein. As to why a metal ion requires time to react with the protein, the author would suggest that in the enzyme-substrate complex the metal ion is linked to the polar groups of the enzyme on the one hand, and to polar groups of the peptide on the other. In this manner a chelate ring may be formed in which the electronic structure of the peptide bond is loosened to such an extent that hydrolysis takes place.

3) The Co^{++} enzyme was more active in the presence of phosphate buffer than veronal buffer.

4) The hydrolysis rate was proportional to the enzyme concentration.

5) Ca^{++} ion acts as an inhibitor of this enzyme in the absence of phosphate, but this inhibition does not occur with phosphate buffer apparently because of the removal of calcium.

6) In the case of cysteine, on the contrary, a higher activity was obtained when it was mixed simultaneously with the enzyme and substrate.

7) This enzyme was also activated by ascorbic acid and reductic acid.

9. An attempt was made to determine the mechanism of enzymatic protein breakdown. The proteolysis was compared to an explosive disintegration whereby the large molecule is split into many small products without an accumulation of intermediates. Such "all or none" splitting was observed when gelatin was exposed to the action of this enzyme.

10. Protein maintains dynamic equilibrium between decomposition and resynthesis *in vivo*. Accordingly, amino-acid metabolism is not characterized by the fact that it is

decomposed to carbon dioxide and water as are carbohydrate and fat. But it is characterized by the fact that the degradation of amino acid may lead to the resynthesis of the same or different type of protein constituent or other biological material being both quantitative and qualitative equilibrium in and out of bacterial cells.

Some bacteria use even amino acid as their energy source. The free energy liberated by an oxidation of L-amino acids transferred to another enzyme reaction, transamination, which requires free energy.

For life to exist, it is an absolute essential that some mechanism should be present for trapping some of the free energy of reaction, for storing it and transferring it so that it can be used for various vital processes.

The role of L-amino acid oxidase in metabolism may be characterized as not that of a simple ammonia liberation, but that of a conversion to the corresponding keto acid, which is then transformed to the L-amino acid by transamination. Thus a micro-organism maintains equilibrium both quantitative and qualitative in and out of cells.

11. The formation of an enzyme within a cell was conditioned by the chemical constitution of the medium, by the physicochemical conditions holding during growth and by the age of the culture.

1) The changes in the external pH during growth were followed by alteration in glutamic dehydrogenase content of the cells, but the pH optimum (pH 7.4) does not vary with the pH of medium during growth.

2) The variation of potential activity and effective activity of glutamic dehydrogenase in relation to changes in pH of medium during growth were studied. The potential activity was roughly constant whatever the pH in the medium. The effective activity was greatly affected by the pH of medium during growth. The potential activity is the activity estimated at the optimal pH of the enzyme and it represents the total formation of enzyme within the cell: the effective activity is the activity estimated at the pH of the environment in which the cell was grown.

3) The presence of sodium chloride in the substrate solution inhibits the activity of glutamic dehydrogenase.

4) The glutamic dehydrogenase was formed to a greater extent when growth occurs at 37° then when at 23°, 30° and 42°.

5) The glutamic dehydrogenase was formed during growth, reaching maximum at about the time of cessation of cell division. After the end of growth the activity declined.

12. Washed suspensions of freshly harvested cells of *Bac. subtilis*, *Bac. subtilis* sp., and *Esch. coli* oxidized common naturally occurring amino acids of L-series. But the rate at which different amino acids are oxidized by these bacterial cell suspensions shows considerable variations, and some amino acids are not all attacked. Aspartic acid, glutamic acid and alanine are oxidized more rapidly than most of the other amino acids.

13. Any of the enzymes which oxidize L-amino acids will be characterizd either on

the basis of their origin or on the basis of some particular substrate which they oxidized readily. The author does not have adequate data to decide precisely how many amino acid oxidases are concerned altogether in bacterial suspension. He undertook to clarify the substrate specificity by comparison of the effects of various inhibitors on the activity of L-amino acid oxidases and of the stability of these enzymes. The experimetal results were as follows:

1) Auto-respiration was promoted by 10^{-3}~10^{-5}M 2,4-dinitrophenol, but the activity of L-amino acid oxidases was inhibited by 10^{-3}M 2,4-dinitrophenol.

These enzymes were strongly inhibited by 10^{-2}M azide.

The auto-respiration and the activity of L-amino acid oxidases were strongly inhibited by 10^{-4}M crystal violet, 10^{-2}~10^{-4}M sodium dehydroacetate, 10^{-2}~10^{-4}M methylene blue and 10^{-3}M KCN.

Caprylic alcohol, even in minute traces in which it dissolves in water, completely inhibited the activity of the enzymes.

10^{-4}M Benzoic acid completely inhibits the activity of the enzymes.

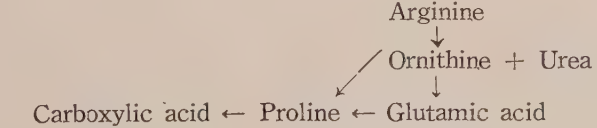
These experimental results are affected by the reaction of multi-enzyme systems, and therefore it was not possible to clarify the substrate specificity of these enzymes.

2) The presence of sodium chloride in the substrate solution inhibits the activity of these enzymes.

3) However, as the age of the bacterial suspension increased, the number of amino acids attacked dwindled. From this experimental result, it is assumed that several enzymes are involved in the oxidation of amino acids by fresh suspensions of bacteria.

14. The intact cells of *Bac. subtilis* were able to accumulate arginine, in the free form within the cells, and the concentration within the cells was higher than that existing in the external medium at equilibrium. The concentration of free arginine within the cells was determined by the balance between the rate at which the amino acid entered the cell and the rate at which it was being metabolized within the cell. A considerable portion of arginine that entered the cell appeared to be converted into cellular matter in subsequent reactions, a dynamic equilibrium existing between uptake and utilization.

The intact cells of *Bac. subtilis* yielded evidence consistent with the idea that the following metabolic pathway was involved.



Citrulline was not found as an intermediate and was not attacked and therefore was ruled out as a possible intermediate.

15. The occurrence and general importance of transaminases in the formation of amino acids has been variously discussed. The advent of the paper chromatographic method

has afforded an opportunity to clarify knowledge on the occurrence of transaminases and their possible relationship to amino acid formation. Studies on a series of transaminases present in *Bac. subtilis* were carried on as follows:

1) The enzyme was prepared by treatment of intact cells with lysozyme and then dialyzed for 20 hrs. at 0° to get a material free from free amino acid.

2) Glutamic-oxalacetic transaminases have been demonstrated which produce glutamic acid from α-ketoglutamic acid with the following amino donors: aspartic acid, alanine, tyrosine, methionine, phenylalanine, valine and histidine, and, to a lesser degree, with lysine, arginine and leucine.

3) Glutamic-pyruvic transaminases have been demonstrated which produce alanine from pyruvic acid with the following amino donors: aspartic acid and glutamic acid.

16. The author would focus attention on one aspect of the problem of enzyme formation by summarizing his present knowledge on the question of the precursor which is converted into active enzyme. Many possibilities can be entertained as to the origin and the nature of the precursor material as well as to the number and the extent of the reactions to transform it into junctional enzyme.

Experimental results obtained by the present writer may be summarized as follows:

Washed suspensions of freshly harvested cells of bacteria oxidized common naturally occurring L-amino acids. But the rate at which different amino acids are oxidized by these bacterial cell suspensions shows considerable variations. Aspartic acid, glutamic acid and alanine are oxidized more rapidly than most of the other amino acids.

The enzyme formation is higher in velocity and larger in amount when oxidizable amino acids are incubated with washed cell suspensions than when non-oxidizable amino acids are incubated with them.

Oxidizable amino acids are oxidized easily to the corresponding keto acid, and then the keto acid is transformed to the L-amino acid by transamination. Thus a large proportion of amino acid synthesized in endogenous reaction is incorporated into protein.

17. Adaptation involves a relation between the organism, the enzyme, and the substrate, but sometimes substances other than the specific substrate may play a part in the formation or activity of an enzyme. The most striking example of this is found when fermentable carbohydrate is added to the medium. No satisfactory explanation of this effect has yet been put forward. The inhibitory action of the presence of glucose during growth on the formation of L-amino acid oxidases could not be attributed to the production of acid and consequent alteration of the medium pH. It can be explained by the action or the behavior of the prosthetic group or the coenzyme of these enzymes.

18. When two different amino acids were added to the cell suspensions of *Bac. subtilis* simultaneously, no competitive interaction was observed between those two acids for the formation of an enzyme corresponding to each amino acid.

There are enzyme systems which are transformed mutually and those which can not be transformed.

CHEMICAL STUDIES ON MARINE ALGAE

X. Free and Combined Amino Acids in Marine Algae

Mitsuzô TAKAGI
Faculty of Fisheries, Hokkaido University

Although only small amounts of nitrate, peptide and organic bases are contained in the protein-free extract of marine algae, it may be considered that the greater part of the extract occurs in the form of free amino acid. Marine algae are characterized by the nitrogen forms in which free amino acids are found to a comparatively rich degree. Ogino[1] has investigated free amino acids occurring in various species of marine algae and recognized, as a rule, the presence of glutamic acid, aspartic acid, alanine, cystine, and arginine. Coulson[2] has also examined free amino acids found in nine species of brown and red marine algae. He reported that glutamic acid, aspartic acid, glycine, alanine, valine, leucine and proline are present in the free state in all the marine algae, whereas cystine, serine, threonine, phenylalanine, arginine and lysine are absent in some species of marine algae, and tyrosine, histidine are absolutely lacking in all species of marine algae examined.

On the other hand, Lugg[3] has investigated the difference in the constituent amino acids of the tissue protein in one marine alga, in four species of cryptogams, *Ulva*, *Lunularia*, *Pteridium* and *Selaginella*, in five species of phanerogams, namely *Dactylis*, *Lolium*, *Beta*, and in two species of *Trifolium*. In addition to the above mentioned experiments in order to ascertain whether there is any correlation between the chemical components among certain of the marine algae and the position occupied by them in the evolutional series, Mazur & Clarke[4] have also determined the amino acids contained in the hot formic acid soluble fractions of (a) *Ulva lactuca*, a green alga, (b) *Laminaria*, and (c) *Sargassum*, both belonging to the brown algae, and (d) *Chondrus crispus* belonging to the red algae.

In the present study, the distribution of the free and combined amino acids occurring in 32 species of marine algae were investigated qualitatively by means of two-dimensional paper chromatography.

Experimental

Immediately after harvesting at Nanaehama and Moheji, both in the vicinity of Hakodate, the fresh marine algae were washed repeatedly with distilled water, dried at room temperature and at 100°C for thirty minutes by the drier, and then milled. Dried materials obtained from the market were also used. Small quantities of these milled materials were extracted three times with 70 per cent ethanol. The insoluble residue, containing 3-5 per cent nitrogen, was then hydrolysed for 24 hrs at 105°C with 6 N

Table 1 (A). Free amino acids

+++, strong ninhydrin colour;
+, weak ninhydrin colour;

	Ulva pertusa (May 8)	*Enteromorpha Linza* (Mar. 9)	*Enteromorpha Linza* var. *crispata* (May 2)
Cystine	−	+	+
Aspartic acid	++	+	+
Glutamic acid	++	++	++
Serine	+	++	++
Glycine + Threonine	+	++	++
Alanine	++	++	++
Tyrosine	−	−	−
Valine	+	+	−
Methionine	−	−	−
Phenylalanine	−	−	−
Leucine	−	−	−
Proline	++	++	+
Tryptophan	+	+	−
Arginine	++	+	−
Lysine	−	−	−
Histidine	−	−	−

	Chorda Filum (June 14)	*Laminaria japonica* (Apr. 25)	*Undaria pinnatifida* f. *distans* (Apr. 28)
Cystine	−	−	−
Aspartic acid	+++	+	+
Glutamic acid	+++	+++	++
Serine	+	+	−
Glycine + Threonine	++	+	+
Alanine	++	+++	+
Tyrosine	−	−	−
Valine	−	−	−
Methionine	−	−	−
Phenylalanine	−	−	−
Leucine	−	−	−
Proline	++	++	+
Tryptophan	+	−	−
Arginine	+	+	−
Lysine	−	−	−
Histidine	−	−	−

in various species of marine algae

++, moderately strong ninhydrin colour;
−, not detected

Enteromorpha intestinalis (June 14)	*Chaetomorpha moniligera* (June 25)	*Leathesia difformis* (June 14)	*Desmerestia ligulata* (May 2)	*Scytosiphon Lomentaria* (May 2)
+	−	+	+	−
+	++	+	+	++
+	+++	+	+	++
+	+	+	+	++
+	+++	+	+	+++
++	++	++	+	++
−	−	−	−	−
−	+	−	−	+
−	−	−	−	−
−	−	−	−	−
−	−	−	−	−
++	++	++	++	++
−	+	−	−	+
−	+	−	−	+
−	−	−	−	−
−	−	−	−	−

Undaria pinnatifida f. *narutensis*	*Hijikia fusiformis* (June 14)	*Sargassum sagamianum* (June 14)	*Sargassum confusum* (June 14)	*Sargassum Thunbergii* (June 14)
−	−	−	−	−
+	++	++	++	++
+	++	++	++	++
−	−	+	+	+
+	−	+	++	+
+	+	++	+	++
−	−	−	−	−
−	++	−	−	+
−	−	−	−	−
−	−	−	−	−
−	−	−	−	−
+	++	++	++	++
−	−	−	−	−
−	−	−	−	−
−	−	−	−	−
−	−	−	−	−

Table 1 (B). Free amino acids

+++, strong ninhydrin colour;
+, weak ninhydrin colour;

	Porphyra Okamurai	*Porphyra crispata*	*Porphyra tenera*
Cystine	−	−	−
Aspartic acid	++	++	+++
Glutamic acid	+++	++	+++
Serine	+	+	+
Glycine + Threonine	++	+	+++
Alanine	+++	++	+++
Tyrosine	+	+	+
Valine	−	−	−
Methionine	−	−	−
Phenylalanine	−	−	−
Leucine	−	−	−
Proline	+	+	++
Tryptophan	+	+	+
Arginine	++	+	+
Lysine	−	−	−
Histidine	−	−	−

	Cirrulicalis Gmelini (Feb. 1)	*Gracilaria verrucosa* (June 14)	*Iridophycus laminarioides* (Apr. 24)
Cystine	−	+	−
Aspartic acid	++	++	++
Glutamic acid	++	+	+
Serine	++	++	+
Glycine + Threonine	++	++	++
Alanine	+	++	++
Tyrosine	+	−	−
Valine	−	−	−
Methionine	−	−	−
Phenylalanine	−	−	−
Leucine	−	−	−
Proline	++	++	++
Tryptophan	+	+	+
Arginine	+	+	+
Lysine	−	−	−
Histidine	−	−	−

in various species of marine algae

++, moderately strong ninhydrin colour;
−, not detected

Porphyra pseudolinearis	*Porphyra umbilicalis*	*Neodilsea Yendoana* (June 14)	*Grateloupia filicina* (Feb. 1)	*Grateloupia livida* (Feb. 1)
−	−	−	−	−
++	++	++	++	++
++	+++	++	+	+++
+	+	++	++	+
++	+	+	++	++
++	++	++	++	+++
+	+	+	+	+
−	−	−	+	+
−	−	−	−	−
−	−	−	−	−
−	+	+	−	−
+	+	++	++	++
+	+	+	+	+
+	+	+	+	++
−	−	−	−	−
−	−	−	−	−

Rhodymenia palmata (Apr. 24)	*Lomentaria catenata* (Feb. 1)	*Delesseria violacea* (May 2)	*Polysiphonia senticulosa* (May 2)	*Chondria crassicaulis* (Feb. 1)
−	−	−	+	−
+++	++	++	++	++
+++	+++	+++	+++	++
++	++	+	++	+
+	+	+	++	+
++	+	++	++	++
+	−	−	−	−
−	+	−	−	+
−	−	−	−	−
−	−	−	−	−
−	−	−	−	−
++	++	++	++	++
+	+	+	−	+
+	+	+	+	+
−	−	−	−	−
−	−	−	−	−

Table 2 (A). Combined amino acids

+++, strong ninhydrin colour;
+, weak ninhydrin colour ;

	Ulva pertusa (May 8)	*Enteromorpha Linza* (Mar. 9)	*Enteromorpha Linza* var. *crispata* (May 2)
Cystine	++	++	+++
Aspartic acid	++	++	+
Glutamic acid	+++	++	+
Serine	++	++	++
Glycine + Threonine	++	++	++
Alanine	+++	+++	+++
Tyrosine	−	−	−
Valine	++	++	++
Methionine	+	+	+
Phenylalanine	++	++	+
Leucine	++	+	++
Proline	+	+	+
Tryptophan	+	+	+
Arginine	++	++	++
Lysine	+	+	+
Histidine	+	+	+

	Chorda Filum (June 14)	*Laminaria japonica* (Apr. 25)	*Undaria pinnatifida* f. *distans* (Apr. 28)
Cystine	+	+	+
Aspartic acid	++	+	+
Glutamic acid	++	+	+
Serine	+++	++	+
Glycine + Threonine	+++	++	+++
Alanine	++	++	++
Tyrosine	·	−	−
Valine	++	++	++
Methionine	+	−	+
Phenylalanine	+	++	+++
Leucine	++	++	++
Proline	+	+	+
Tryptophan	+	+	+
Arginine	++	++	++
Lysine	+	+	−
Histidine	+	+	+

in various species of marine algae

++, moderately strong ninhydrin colour;
−, not detected

Enteromorpha intestinalis (June 14)	*Chaetomorpha moniligera* (June 25)	*Leathesia difformis* (June 14)	*Desmerestia ligulata* (May 2)	*Scytosiphon Lomentaria* (May 2)
+	+	++	+	+
+	++	++	++	++
++	+	++	++	+
++	++	+	++	++
+	++	+	++	++
++	++	++	++	++
−	−	−	−	+
++	++	++	++	++
+	+	−	+	+
++	++	+	++	++
+	++	++	++	++
+	+	+	+	+
+	+	+	+	+
++	++	++	++	++
+	+	+	+	+
+	+	+	+	+

Undaria pinnatifida f. *narutensis*	*Hijikia fusiformis* (June 14)	*Sargassum sagamianum* (June 14)	*Sargassum confusum* (June 14)	*Sargassum Thunbergii* (June 14)
+	+	+	+	++
+	+	+	++	++
+	+	+	+	+
++	+	++	++	+
++	++	+++	++	++
++	++	++	++	++
+	−	+	−	−
++	+	++	++	++
+	+	+	+	+
++	++	++	++	++
++	++	++	++	++
+	+	+	+	+
+	+	+	+	+
++	++	++	++	+
+	−	+	+	+
+	−	+	+	−

Table 2 (B). Combined amino acids

+++, strong ninhydrin colour;
+, weak ninhydrin colour ;

	Porphyra Okamurai	*Porphyra crispata*	*Porphyra tenera*
Cystine	+	++	+
Aspartic acid	++	++	++
Glutamic acid	+++	++	++
Serine	++	++	++
Glycine + Threonine	++	++	+++
Alanine	+	++	+++
Tyrosine	+	+	+
Valine	++	++	++
Methionine	+	+	+
Phenylalanine	+	++	++
Leucine	++	+++	+++
Proline	+	+	+
Tryptophan	+	+	+
Arginine	++	++	++
Lysine	+	+	+
Histidine	+	+	+

	Cirrulicalis Gmelini (Feb. 1)	*Gracilaria verrucosa* (June 14)	*Iridophycus laminarioides* (Apr. 24)
Cystine	+	+	+
Aspartic acid	++	+	++
Glutamic acid	++	+	+
Serine	++	+	++
Glycine + Threonine	++	++	+++
Alanine	++	+	++
Tyrosine	+	−	−
Valine	++	++	+++
Methionine	+	+	+
Phenylalanine	++	++	++
Leucine	++	++	++
Proline	+	+	+
Tryptophan	+	+	+
Arginine	++	++	++
Lysine	+	+	+
Histidine	+	−	+

in various species of marine algae

++, moderately strong ninhydrin colour;
−, not detected

Porphyra pseudolinearis	*Porphyra umbilicalis*	*Neodilsea Yendoana* (June 14)	*Grateloupia filicina* (Feb. 1)	*Grateloupia livida* (Feb. 1)
+	+	+	+	+
++	++	+	++	+
++	++	+	++	+
+	++	+	++	++
+++	+++	++	++	++
++	++	++	++	++
+	+	+	+	+
++	+++	++	+	++
+	+	+	+	+
++	++	++	++	++
+++	+++	++	++	++
+	+	+	+	+
+	+	+	+	+
++	++	++	++	++
+	+	−	+	+
+	+	−	+	+

Rhodymenia palmata (Apr. 24)	*Lomentaria catenata* (Feb. 1)	*Delesseria violacea* (May 2)	*Polysiphonia senticulosa* (May 2)	*Chondria crassicaulis* (Feb. 1)
+	+	+	+	+
+	++	++	++	+
+	++	++	++	+
++	++	++	++	++
++	++	++	++	++
++	++	++	++	++
+	+	+	−	−
+++	+++	+++	++	++
+	+	+	+	+
++	++	++	++	++
++	++	++	+	+++
+	+	+	++	+
+	+	+	++	+
	++	++	+	++
+	+	+	−	+
+	+	+	+	+

hydrochloric acid. The alcoholic extracts and protein hydrolysates were concentrated and evaporated to dryness. The amino acids present in these preparations were investigated qualitatively using two-dimensional paper chromatography. Aliquots containing 0.5 mg of amino acids were used for each chromatogram. Tōyō No. 2 filter paper sheets (40 cm×40 cm) were used throughout the present experiments. One hundred and two gm of phenol which were added 15ml of 0.1 per cent ammonium hydroxide solution were used as the first developing solvent, and the n-butanol-acetic acid-water (4:1:2) as the second solvent.

RESULTS AND DISCUSSION

The accompanying tables show the relative intensities of the amino acid spots obtained after ninhydrin treatment of the developed chromatograms.

According to the results shown in Table 1, the differences were fairly observable respectively between each of the marine algae, namely: *Undaria pinnatifida* f. *distans*, *U. pinnatifida* f *narutensis*, *Hijikia fusiformis*, *Sargassum sagamianum* and *S. confusum* have comparatively few free amino acids; *Enteromorpha Linza* var. *cripata*. *E. intestinalis*, *Leathesia difformis*, *Desmarestia ligulata*, *Chorda Filum*, *Laminaria japonica*, *Sargassum Thunbergii*, *Iridophycus laminarioides*, *Delesseria violacea* and *Polysiphonia senticulosa* have more free amino acids; *Ulva pertusa*, *Enteromorpha Linza*, *Chaetomorpha moniligera*, *Scytosiphon Lomentaria*, *Porphyra Okamurai*, *P. crispata*, *P. tenera*, *P. pseudolinearis*, *P. umbilicalis*, *Neodilsea Yendoana*, *Grateloupia filicina*, *G. livida*, *Cirrulicarpus Gmelini*, *Gracilaria verrucosa*, *Rhodymenia palmata*, *Lomentaria catenata* and *Chondria crassicaulis* have the most numerous free amino acids among these marine algae.

Chaetomorpha moniligera, *Chorda Filum*, *Laminaria japonica*, *Porphyra Okamurai*, *P. tenera*, *P. umbilicalis*, *Grateloupia livida*, *Rhodymenia palmata*, *Lomentaria catenata*, *Delesseria violacea* and *Polysiphonia senticulosa* differ in their contents of free glutamic acid from those of other marine algae. *Chaetomorpha moniligera*, *Scytosiphon Lomentaria* and *Porphyra tenera* show dominant presence of free glycine and threonine, while *Laminaria japonica*, *Porphyra Okamurai*, *P. tenera* and *Grateloupia livida* are rich in free alanine, and lastly *Chorda Filum*, *Porphyra tenera* and *Rhodymenia palmata* are abundant in free aspartic acid contents.

As to the free amino acid occurring in marine algae, in general, aspartic acid, glutamic acid, serine, glycine, threonine, alanine and proline are comparatively rich. Then cystine, tyrosine, valine, methionine, phenylalanine, leucine, tryptophan, arginine, lysine and histidine are absent or present in only small amounts in their free state if they do occur.

On the other hand, Table 2 shows that cystine, aspartic acid, glutamic acid, serine, glycine, threonine, alanine, valine, methionine, phenylalanine, leucine, proline and arginine

are commonly contained as combined amino acids in marine algae. Tyrosine, lysine and histidine appear to be absent in combined state in some species of marine algae. However, even when ninhydrin colour reaction is negative, there is insufficient basis for a conclusion that these amino acids never occur in marine algae, because the minimum detectable amounts of these amino acids with ninhydrin are great. Tryptophan was detected on chromatograms of 5 N barium hydroxide hydrolysates of the marine algae. The author confirmed its presence by using P-dimethylaminobenzaldehyde in strong hydrochloric acid as a spraying reagent, whereupon it appeared as a blue-coloured spot.

Large amounts of aspartic acid, glutamic acid, serine, glycine, alanine, valine, phenylalanine, leucine and arginine proved to be present as constituents of algal protein. Especially, valine, phenylalanine and leucine occur without exception in large amounts as combined amino acids in all the marine algae examined, notwithstanding the fact that these amino acids are absent or occur only in small quantity as free amino acids. Lastly the contents of cystine, methionine, proline, tryptophan, lysine and histidine appeared to be less in quantity as compared with those of the amino acids above mentioned.

SUMMARY

The present paper deals with the results of experiments on free and combined amino acids occurring in five species of marine green algae, 11 species of marine brown algae and 16 species of marine red algae. Differences in amounts and varieties of various amino acids were observed as shown in Tables 1 and 2.

The author acknowledges with hearty thanks the immutable direction and encouragement afforded by Prof. Kiichi Murata throughout the course of this investigation.

BIBLIOGRAPHY

1) Ogino, C. (1955). *J. Tokyo Univ. Fish.* 41, 124.
2) Coulson, C. B. (1953). *Chem. & Ind.* 971.
3) Lugg, J. W. H. (1943). *Biochem. J.* 37, 132.
4) Mazur, A. & Clarke, H. T. (1938). *J. Biol. Chem.* 123, 729.

CHEMICAL STUDIES ON MARINE ALGAE

XI. On the Tasty Ingredients of "ASAKUSANORI", *Porphyra tenera*

Kiichi MURATA, Mitsuzô TAKAGI and Mitsuo KURIYAMA
Faculty of Fisheries, Hokkaido University

Though various investigations[1)2)] have recently been carried out on the free amino acids occurring in marine algae, all of these analyses have been qualitative. "ASAKUSANORI" or *Porphyra tenera* is ore of the nourishing algal foods commonly eaten with great relish. Nevertheless, its tasty ingredients have not been exactly described by any investigator. Recently, Tsuchiya and Suzuki[3)] have reported that glutamic acid, glycine and alanine are good tasty ingredients and especially alanine is a sweet one, on the whole, in *Porphyra tenera.*

In the present study, free amino acids participating as tasty ingredients of *Porphyra tenera* have been determined quantitatively by the technique of ion exchange perfected by Moore and Stein.[4)]

EXPERIMENTAL

Methods——"ASAKUSANORI", dried materials obtained from the open market were used. One gm of the dried materials was cut into small pieces and extracted by shaking occasionally with 100 ml of 70 per cent ethanol for 24 hours. After this treatment had been repeated three times, the extracts were mixed, concentrated in vacuo and filled up to 10 ml.

Total nitrogen and alcoholic extracted nitrogen were estimated by the micro-Kjeldahl procedure.

Aliquots corresponding to 4–5 mg of amino acids were used for determining free amino acids quantitatively by the technique of ion exchange used by Moore and Stein.

RESULTS

The contents of the total and alcoholic extracted nitrogen of *Porphyra tenera* are shown in Table 1. Though the date of collection is unknown because materials were

Table 1. Nitrogen forms of *Porphyra tenera*

Species	Date of collection	Total N	Alcoholic extracted N	Alcoholic extracted N / Total N
		per cent	*per cent*	*per cent*
Porphyra tenera	——	6.664	1.005	15.1

bought on the market, their total nitrogen content was 6.6 per cent. Thus the dried materials were found to be high in total nitrogen content and of good quality as samples

of "ASAKUSANORI". The alcoholic extracted nitrogen amounted to 1.0 per cent and its ratio to the total nitrogen was about 15.0 per cent.

The effluent curves obtained with the alcoholic extracts from the alga on a column of Dowex 50 resin are illustrated in Fig. 1. The distribution of the nitrogen of the

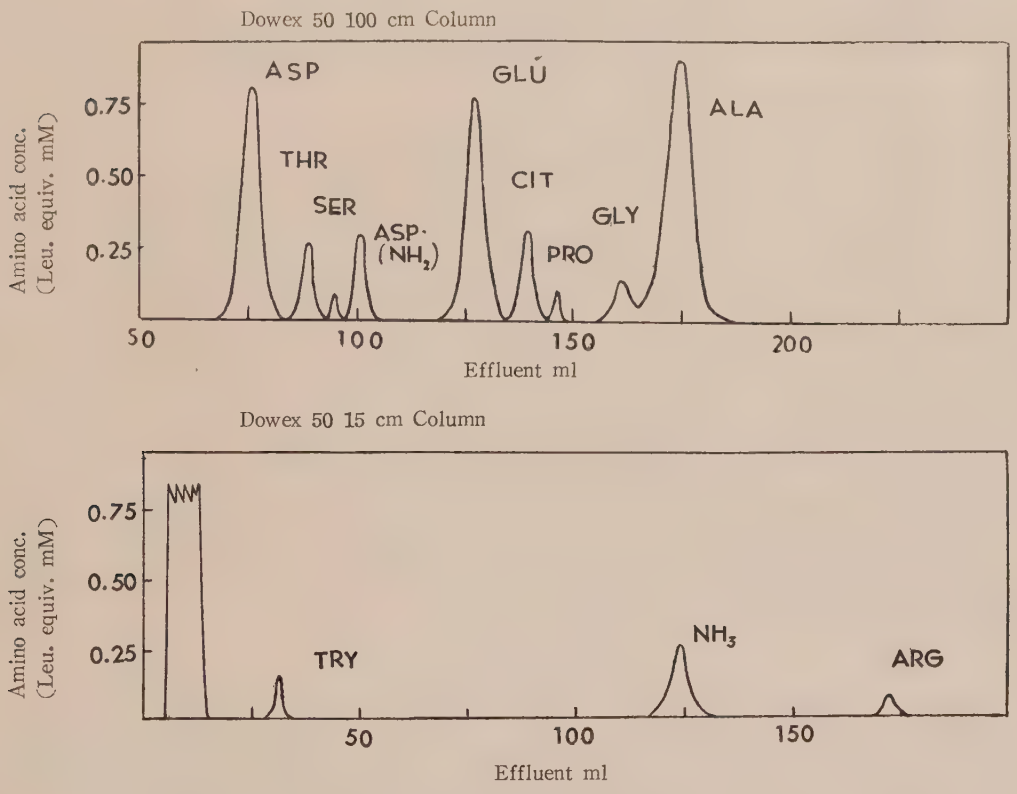


Fig. 1. Section of effluent curves obtained with alcoholic extracts of *Porphyra tenera* on a column of Dowex 50 resin

free amino acids in the alga calculated from Fig. 1 is reported in Table 2 as mg percentage of the dried materials.

It may be considered that the distribution of free amino acids in the alcoholic extracts of *Porphyra tenera* differs according to the harvesting time and locality. Therefore, the results reported in Table 2 represent only one instance of the alcoholic extract constituents of *Porphyra tenera*.

Nevertheless, the presence of aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, glycine, alanine and asparagine in the free state appeared to be very similar to Tsuchiya and Suzuki's results with the exception of absence of proline, tryptophan, arginine and citrulline.

According to the same authors, an amount of alanine corresponding to about ten

Table 2. The contents of free amino acids occurring in alcoholic extracts of *Porphyra tenera*

Amino acid	Author's result	Tsuchiya and Suzuki's result
	mg per cent	*mg per cent*
Aspartic acid	817.2	++
Threonine	154.7	++
Serine	40.4	+
Asparagine	214.4	+
Glutamic acid	768.2	+++
Citrulline	240.9	
Proline	111.8	
Glycine	89.1	20− 101
Alanine	942.7	20−1177
Tryptophan	132.5	
Arginine	56.5	−
Ammonia	48.3	

foldthat of glycine was contained in the alcoholic extracts of *Porphyra tenera*. Likewisely, large amounts of alanine, aspartic acid and glutamic acid were found to be present in the alcoholic extracts of *Porphyra tenera* in the present experiment. The contents of citrulline, asparagine, threonine, tryptophan and proline come next in amount to the above amino acids, and that of glycine, arginire and serine are minimum among the free amino acids occurring in *Porphyra tenera*.

DISCUSSION

Valine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanire, histidine, lysire and ornithine are not able to be determined in the alcoholic extracts of *Porphyra tenera* by this technique. Accordingly, provided that these amino acids are contained in the free state in the alga, it may be affirmed without hesitation that their contents are only to a barely appreciable degree. Fowden[5] has confirmed the presence of asparagine, glutamire and citrulline in *Chlorella vulgaris*, fresh water alga. Coulson[1] has reported that the marine algae examined differ from fresh water ones and land plants in that they not only show a preference for peptides but these amides excluding citrullire now under consideration seem to be absent.

The present research, however, has proved that asparagine and citrulline are present in the alcoholic extracts of *Porphyra tenera*. Smith and Young[6] have recognized exceptionally the presence of citrulline and ornithine in *Chondrus crispus*, marine red alga. Further investigations should be performed in future to ascertain whether these amides and amino acids are present or not in other marine algae, such as green, or brown as well as red ones.

SUMMARY

The distribution of the free amino acids occurring in the alcoholic extracts of *Porphyra tenera* has been determined quantitatively by Moore and Stein's technique of ion exchange. The results obtained are as follows: aspartic acid 817.2 mg per cent; threonine 154.7; serine 40.4; asparagine 214.4; glutamic acid 768.2; citrulline 240.9; proline 111.8; glycine 89.1; alanine 942.7; tryptophan 132.5; arginine 56.5; and ammonia 48.3 mg per cent to the dried materials.

BIBLIOGRAPHY

1) Coulson, C. B. (1953). *Chem. & Ind.*, 971.
2) Ogino, C. (1955). *J. Tokyo Univ. Fish.* 41, 124.
3) Tsuchiya, Y. & Suzuki, Y. (1955). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 20, 1092.
4) Moore, S. & Stein, W. H. (1951). *J. Biol. Chem.* 192, 663.
5) Fowden, L. (1951). *Nature*, 167, 1030.
6) Smith, D. G. & Gordon, Y. E. (1955). *J. Biol. Chem.* 217, 845.

可溶性アルギン酸塩類に関する研究

第1報　同一のアルギン酸に由来する，リチウム，ナトリウム，カリウム，アンモニウム各塩類の粘性挙動について

小黒美樹・鈴木昇
（北海道大学水産学部海藻化学教室）

Studies on Soluble Alginates

(I) The viscosity of the soluble alginates including Lithium alginate, Sodium alginate, Potassium alginate and Ammonium alginate

Miki OGURO and Noboru SUZUKI

Abstract

The purpose of this series of reports is to compare the colloidal and chemical properties of various soluble alginate solutions which were made from a batch of alginic acid. Alginic acid was prepared after Suzuki's method from a brown algae, ***Laminaria Angustata*** KJELLM. From the alginic acid samples of soluble alginates were prepared, such as lithium alginate, sodium alginate, potassium alginate and ammonium alginate.

The methods for the determination of the moisture and acidity of alginic acid as well as the viscosity of the alginate solutions were examined.

The results obtained are summarized as follows:

1. The estimation of moisture of the materials, both alginic acid and various alginates, should be performed by heating in Abderhalden's apparatus at boiling point of ethanol for 5 hours avoiding the decomposition of the materials because certain materials, such as lithium and ammonium alginate, are colored by heating at 100° C for a few hours.
2. The method for acidity determination of alginic acid was examined with or without the addition of sodium chloride.

From the examination, it is demonstrated that the determination of acidity should be done with the addition of an excess of simple electrolyte.

3. The η_{sp}/c value was arranged as follows:

Lithium alginate > Sodium alginate > Potassium alginate > Ammonium alginate

In a gel region, log η_{sp}/c – log η_{sp}/c in NaCl curve of each soluble alginate solution is rectilinear.

The exponent (n) obtained from the gradient of the curve is considered to correspond to the shape of the molecules in alginate solution.

The n values are as follows:

Lithium alginate	0.98
Sodium alginate	0.52
Potassium alginate	0.40
Ammonium alginate	0.25

From the above data, it is suggested that the molecules of sodium alginate, potassium alginate and ammonium alginate in solutions are folded into random coils whereas the chain of lithium alginate molecules is unfolded.

緒　　言

アルギンは，天然産高分子電解質として最も典型的なもの一つで，アルギン酸ソーダ水溶液の膠質学的性質については，高橋[1]，遠藤[2]，清山[3]，加藤[4]等の研究があるが，可溶性アルギンの中で，ナトリウム塩以外の塩類については，高橋[5]が重合度の異なる，カリウム，アンモニウム，リチウム各塩類の電導度について研究している外は殆んど研究が見られない。

同一のアルギン酸から，同一の条件で調製せられたアルカリ塩類の膠質学的並びに化学的研究を行つたものは少く，著者の一人，小黒[6]はさきに前報に於て同一のアルギン酸より調製した，ナトリウム，カリウム，マグネシウム各塩類について，測定温度を異にした時の粘性について報告した。著者等は，更に詳細に同一のアルギン酸に由来する，リチウム，ナトリウム，カリウム，アンモニウム各塩類の膠質学的並びに化学的性質について検討を加えつゝあるが，本報においては，アルギン酸及びそれに由来する，リチウム，ナトリウム，カリウム，アンモニウム各塩類の調製法，水分，酸度等の測定法について検討し，更に高分子電解質的特性の大要を比較するため，粘性挙動について検討した結果について報告する。

本実験の遂行に当つて実験に協力した大学院学生柏倉民知君に深く感謝する。

実　験　の　部

I　アルギン酸の抽出，精製及び各塩類の調製

試料たるアルギン酸の調製にあたつては，濾過操作が容易で且つ純良な高粘性アルギン酸を得ることが出来る鈴木法[7]によつた。

北海道日高産三石昆布 *Laminaria angustata* KJELLM. 風乾物 1.5 kg に水24*l* を加へ30分間煮沸して可溶性成分を除去し，次いで 0.3% $CaCl_2$ 溶液 24*l* に原藻を浸漬，30分間煮沸して原藻中の遊離型のアルギン酸の大部分を Ca－塩に変化せしめると同時に，色素層を固定し，爾後の操作による色素の溶出を防止せしめた。$CaCl_2$ 溶液で処理した原藻は充分水洗し，0.3% NaCl 溶液 24*l* 中に移し，30分間煮沸し藻体中の一部のアルギンをイオン交換によつて溶出せしめたる後，加熱を止め 90°C に温度が降下するのをまつて，150 g の Na_2CO_3 を溶液に添加して3時間放置し，藻体中のアルギン酸カルシウムをアルギン酸ソーダとして溶出せしめた。この液の布濾しを数回反覆し，溶液に濾過助剤として HYFLO SUPER-CEL を加へて濾紙を用いて濾過して透明な濾液を得，これに10%の $CaCl_2$ 液を加えて，アルギン酸カルシウムを析出せしめ，布濾し，0.1 N HCl 中に浸漬して，脱カルシウムを行い，完全に脱カルシウムされたアルギン酸ゲルに Na_2CO_3 を加えて溶解し，再びアルギン酸カルシウムを析出せしめ，同様操作を数回反覆して，純粋なアルギン酸ゲル 790 g を得た。此の中 190 g のアルギン酸ゲルはそのまゝアセトン，エーテルにて洗滌し，室温にてアセトン及びエーテルを揮散せしめ，真空デシケーター中で減圧乾燥してアルギン酸試料とした。又各塩類の調製法は，得られたアルギン酸ゲルの150 g をそれぞれ3*l* の水に浸漬し，之に夫々アルギン酸の中和当量の3倍量の Li_2CO_3,

Table 1.　Gel formation by solvents

Alginate	Ethyl alcohol	Methyl alcohol	Acetone
Li-alginate	Jellified	Uncoagulated	Coagulated (Hygroscopic)
Na-alginate	Coagulated	Coagulated	Coagulated
K-alginate	〃	〃	〃
NH_3-alginate	Slightly coagulated (Hygroscopic)	Uncoagulated	Coagulated (Hygroscopic)

Na_2CO_3, K_2CO_3 及び $(NH_4)_2CO_3$ を加えて溶解せしめ，それぞれリチウム，ナトリウム，カリウム及びアンモニウムの各塩類水溶液を調製した。茲に得られた各塩類水溶液から乾燥試料を得るに当つては，出来るだけ同一の条件下で脱水することが望ましいので，脱水，ゲル化については，次の如き予備実験を行つた。即ち試験管に各塩類水溶液の一定量をとり，それらに等量のエタノール，メタノール及びアセトンを加えて，ゲルの生成の状況を検した結果は，第1表の如くである。第1表の結果から，アセトンが各塩類の水溶液からアルギン酸塩を一番よく脱水，ゲル化せしめるものである事を知つたので，等量以上のアセトン中にアルギン酸リチウム，アルギン酸ナトリウム，アルギン酸カリウム，アルギン酸アンモニウム水溶液を注加して夫々の塩を析出せしめた。アセトンによつても各塩類溶液の脱水，ゲル化には難易があり，アルギン酸リチウムは最もゲル化され難く，アルギン酸アンモニウム，アルギン酸カリウム，アルギン酸ナトリウムの順に次第にゲル化は容易となる。次いでアセトンにて充分洗滌したる後，30%アセトン液中に浸漬して透析液中の CO_3^{--} の反応が消失するに至れば，之を水に溶解して，アセトンにてゲルを析出せしめ，30%アセトン液で透析することを数回反覆精製し，之をアセトン及びエーテルでもつてそれぞれ洗滌した後，室温でアセトン及びエーテルを揮散せしめ，真空デシケーター中で減圧乾燥して，夫々アルギン酸リチウム 20g，アルギン酸ナトリウム 22g，アルギン酸カリウム 22g，アルギン酸アンモニウム 7gを得た。

II　アルギン酸の分光定性分析

試料アルギン酸の灰分を定量した結果，0.2%であつた。この灰分を島津製作所研究部へ依頼して，島津中型分光写真器 QF—60 型によつて分光定性分析をしてもらつた結果は第1図の通りである。第1図より含有されている主な金属を下記すれば，次の通りであることが判る。

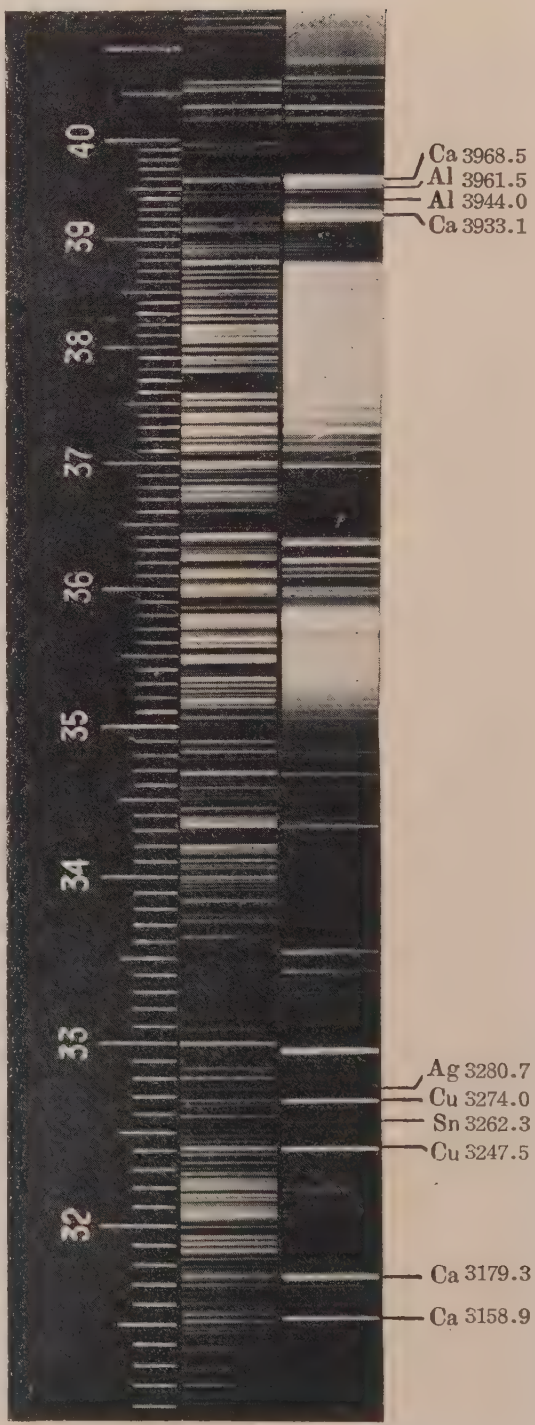


Fig. 1. Spectrum diagram of alginic acid

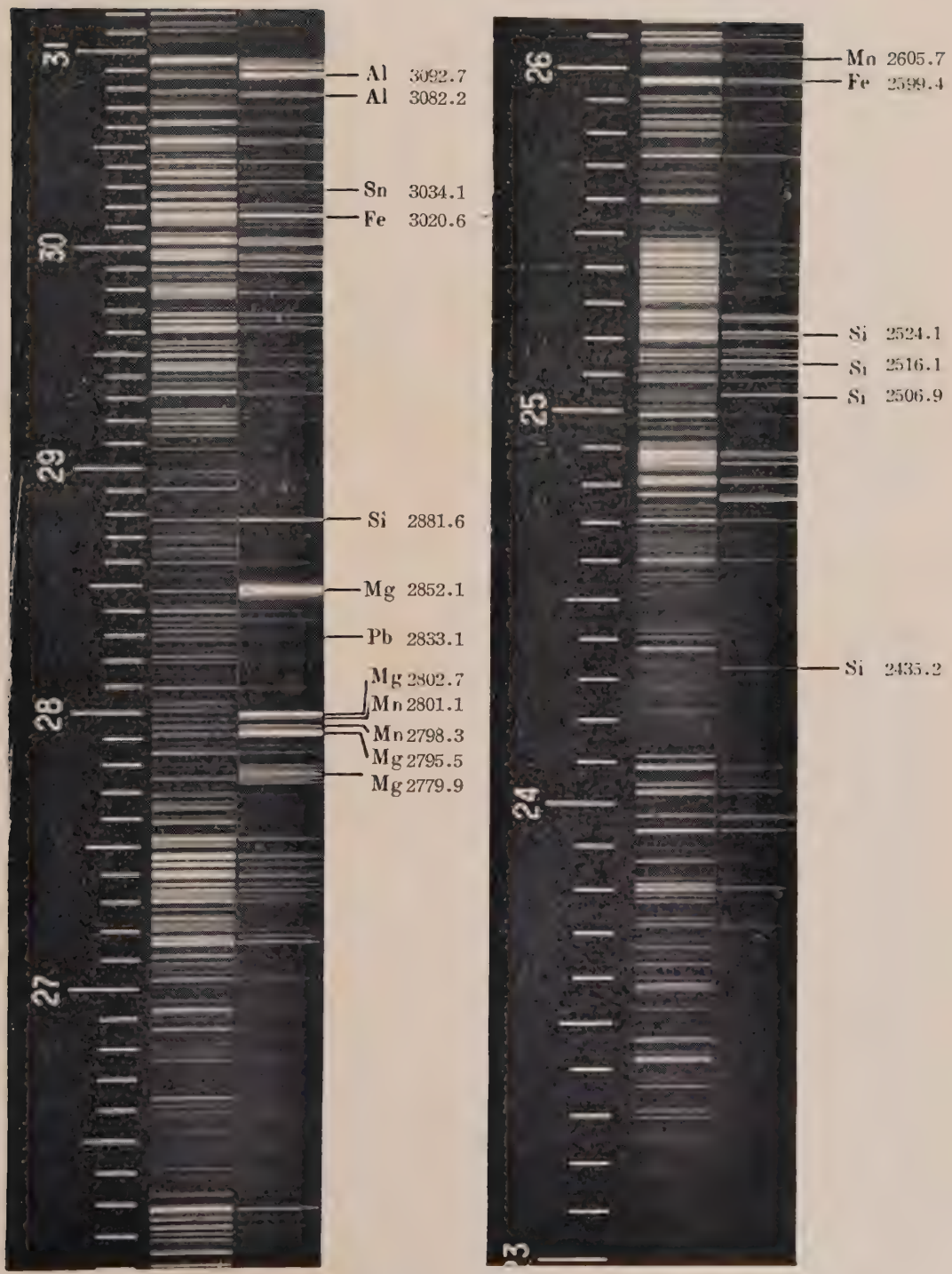


Fig. 1. Spectrum diagram of alginic acid (Continued)

Ca, Al, Cu, Ag, Sn, Si, Mg, Mn, Fe, Pb.

Bartlet, List, Page, Chapman[8] 等により微量の As, Pb, Zn, Pb が含まれているという報告があるが，これら金属は，アルギン酸に本質的に含まれているものであるか，或は調製過程中に薬品等から混入してアルギン酸とカチオン交換で結合したものであるかに就いては明らかでない。

アルギン酸の灰分の分光定性分析を島津製作所研究部へ依頼するに当つて種々御便宜を与えてくれた杉沢九二男氏並びに分析の労をわずらわした同社研究部副部長工学博士橘芳実氏に対し厚く感謝の意を表する。

III 試料の水分について

アルギンの如き親水性膠質のゲルの水分を測定することには，種々の困難が伴うものであつて，加熱による脱水と共に重合度が減少し，或は熱分解を惹き起すおそれがある。清山[3] によれば 100°C 以上では緩漫な熱分解が起り，170°C にて急激な熱分解を起すので，100° C で空気乾燥を行うことが適当であると述べ，恒量に達するためには，アルギン酸ソーダでは 30時間を要したと報告し

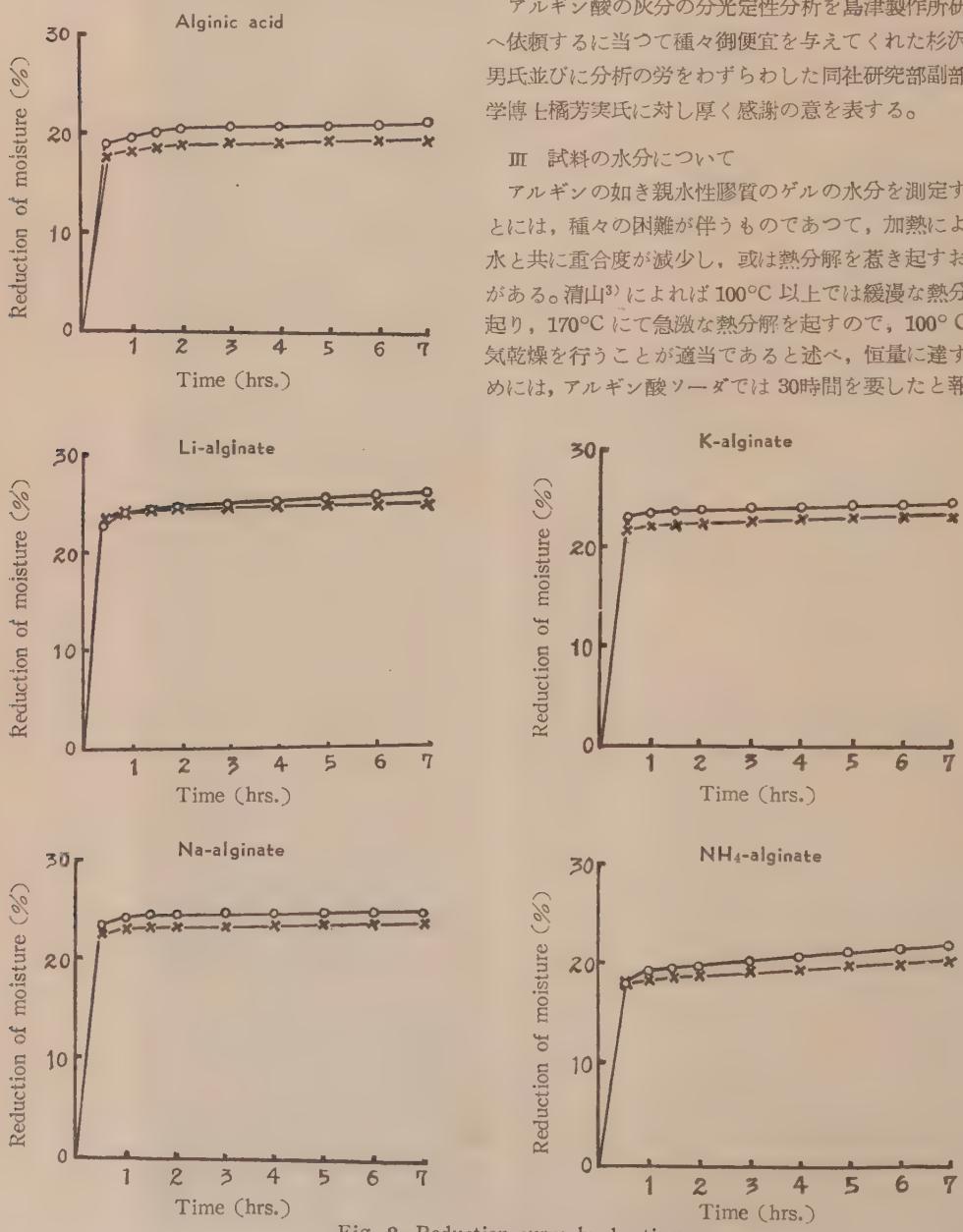


Fig. 2. Reduction curve by heating

○ —— ○ Heated at 100° C × —— × Heated at 78° C

ている。著者等の経験によれば，100°C 以下で乾燥を行つた場合に於ても屢々数時間にして着色（淡黄色，黄褐色）する場合があるので，此の点については更に検討する必要を認め以下の実験を行つた。

i　実験方法

乾燥方法はアルギン酸及び夫々の塩類について，Abderhalden 減圧乾燥器中で水及びエタノールの夫々の沸点で，30乃至420分に亘つて減量を測定した。

ii　実験結果及び考察

Abderhalden 減圧乾燥器中で水の沸点100°C で乾燥せしめた場合には，アルギン酸アンモニウムに於ては120分で既に着色し始め，アルギン酸リチウムに於ては180分で着色をしたが，他の塩類は肉眼的に変化が認められなかつた。同様にしてエタノールの沸点78°Cで行つた場合は，一般に着色は認められなかつたが，アルギン酸アンモニウムのみは360 分にして僅かに着色した。乾燥時間と減量との関係を図示したのが，第2図である。

第2図で明らかな様に，アルギンの脱水は却々困難で着色其他の肉眼的変化が，100° C 又は78°C の乾燥に於てさえ認められ，当然，此の際，物理的或は化学的変化が予想せられるので，本実験では，著者等は Abderhalden 減圧乾燥器でエタノールを用いて，5時間乾燥を行つて，その減量を一応水分とした。此の点については，加熱によるアルギンの分解が起るか否かについて，加熱による脱炭酸其他の化学的性質，並びに重合度の変化等について検討中である。

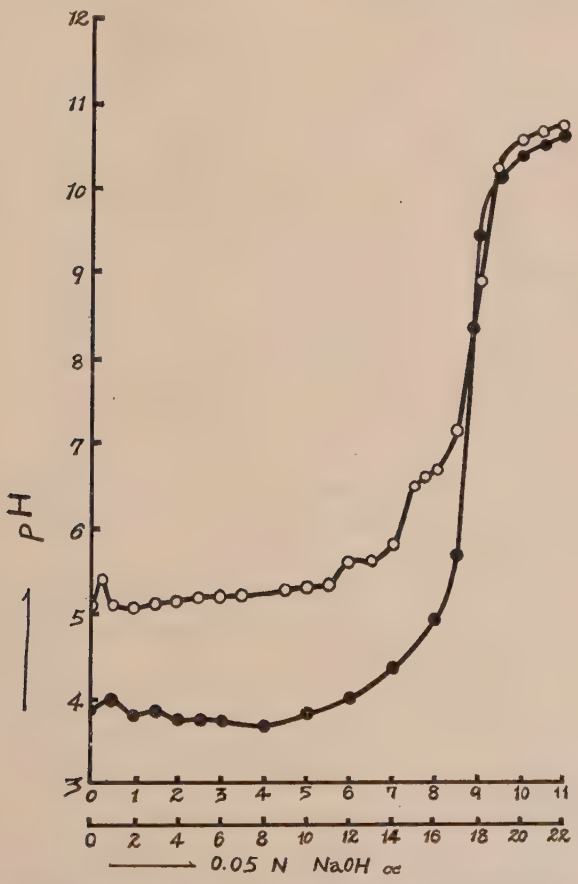


Fig. 3. Titration curve of alginic acid with N/20 NaOH
○———○　material weight, 0.1753 g
●———●　material weight, 0.0764 g

IV　アルギン酸の酸度

アルギン酸の酸度については，測定者によつて多少の差異がある。即ち三輪[9]は直接滴定42.5cc. 間接測定56.3ccであつて，アルギン酸の酸基4個の中1個がラクトンを形成していると説明しているが，清山[3]は，此の様な差異は認められず，直接滴定及び間接滴定の値は一致したと述べている。アルギン酸の中和に於てはその過程に於て，未溶解のゲルが極めて膨潤し，ゲルの内部にまでアルカリが浸透するのに長時間を要し，中和値の一定しないおそれがあるので，試料は出来るだけ微粉末とすべきであるが，高粘性のゲルの場合は繊維性であつて容易に粉末となし得ない。斯る試料にあつては，試料は測定の誤差範囲内に於ては出来るだけ少量用いた方が適当であると考えられるので，試料の量と滴定酸度の測定値との関係について調べてみた。その一例を挙げると，乾燥アルギン酸を0.1753 g と0.0764 g 秤取し，夫々水100ccを加え0.05 N NaOHを1cc 宛加え，添加後5分間宛マ

グネテイックスタラーを用い，同一条件で攪拌後硝子電極 pH メーターにてpHを測定した。其の滴定度曲線は第3図の如くであつて，この図より分子量を計算してみると，第2表の通りである。従つて，この条件の

Table 2. Molecular weight calculated from titration

Sample weight (g)	Molecular weight (obsd.)	Molecular weight (calcd.)
0.1753	141.5	176.1
0.0764	168.2	176.1

下では試料の多いときは，上に述べた様な原因のため過少の値が出るように思われるので，試料は出来るだけ少量を用いた方がよいと思われる。

アルギン酸をアルカリで溶解させる場合に，アルギン酸は，既に酸性領域で溶解するが，その分子の周囲にイオン雲を形成するため，過剰の電解質が殆んどない稀アルカリ滴定では，このイオン雲を破壊して中心までアルカリが浸入出来ないものと考えられる。従つて，過剰の電解質を加えることによつて，アルギン分子を取まくイオン雲を消失せしめなければ，中和は完全に行われないと考えられるので，此の点について次の如き実験を行つた。

アルギン酸 0.1080 g に，1 N NaCl 溶液 100cc を加えたもの，及び 0.1063 g に水 100cc を加えたものについて，$N/_{20}$ NaOH 1 cc 宛加えて，添加後5分間宛マグネテイックスタラーを用い，同一条件で攪拌後硝子電極 pH メーターにてpH を測定した。その結果は，第4図に示す通りである。電解質を加えない場合に於て，弱酸—強塩基の典型的な滴定曲線は見られない。清山[3]の報告によれば，中和点は pH 6.0～6.5の間にあつて，この事は注目すべきことであると述べているが，著者等の数多くの実験結果では，中和点は，何れも pH 7.30～7.60 の間にあつて，清山[3]の述べた如き低い値は見られなかつた。

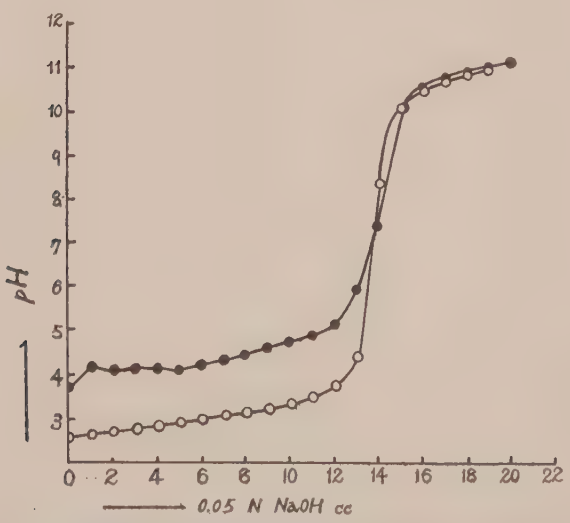


Fig. 4. Titration curve of alginic acid, showing the effect of the presence of NaCl
●———● without adding electrolyte
○— — —○ adding electrolyte

電解質の過剰が存在する時に於ては，弱酸—強塩基の典型的な滴定度曲線が得られ，中和点は，pH 6.60～7.10の間にある。第5図の中和点（アルカリ所要量）より，アルギン酸の分子量を計算すれば 171.6 であつて，ウロン酸無水物としての計算値 176.1 より低い値が得られた。

次に過剰のNaClが存在した場合と，しからざる場合について，pH メーターを用いることなく，常法に従つて，フエノールフタレンを指示薬として用い，直接及び間接滴定を行つた。その結果の一例を示すと，第3表の通りである。第3表からわかる如く，NaClの存在する場合に於ても，然らざる場合に於ても，直接滴定及び間接滴定の両測定値には，三輪[9]の述べた如き差異は認められなかつたが，NaCl 溶液中で滴定を行つた測定値は，一般に水の中で行つた測定値よりも低い値が得られ，pH メーターを用いた場合と同様の結果が得られ，NaCl

Table 3. Molecular weight calculated from titration with addition of NaCl

Electrolyte (1 N NaCl)	Molecular weight	
	Calculated from Direct titration	Calculated from Back titration
Without adding electrolyte	185.0	188.9
Adding electrolyte	180.5	184.9

溶液中では，アルカリによる溶解が容易であることが判る。従つて，アルギン酸の中和滴定によつて，酸度を測定する場合には，過剰の NaCl の存在の下で中和を行うことによつて，水の中で中和を行う従来の方法より正確な値が得られるものと思われる。

アルギン酸は，従来，マンウロン酸のみの重合体と考えられていたが，最近になつて，Chanda[10] 等は，アルギン酸分子の中に，数%の glucose の存在を認め，Fischer[11] 等は，アルギン酸はマンウロン酸及びグロン酸よりなることを認めているなど，その構造に関して，再検討が加えられるに至つており，滴定酸度についても，更に詳細な検討が望まれるわけで，此の点については目下研究中である。

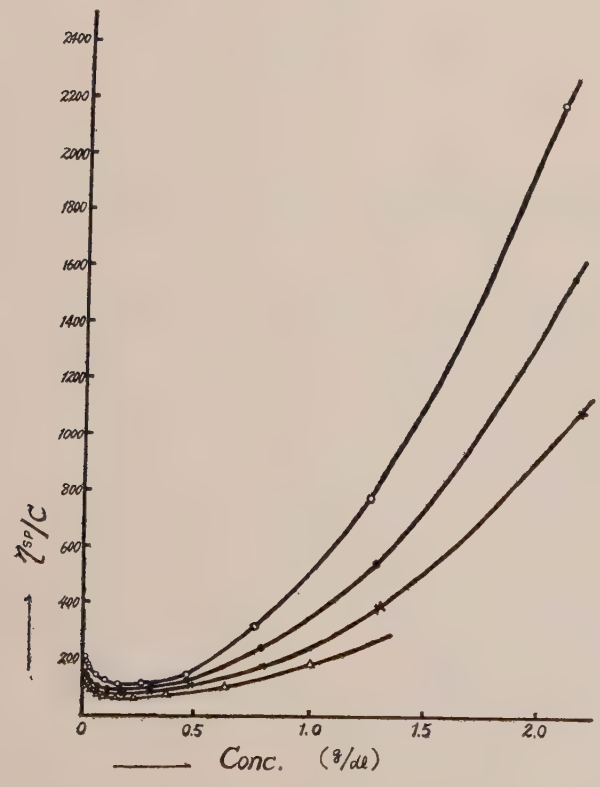


Fig. 5. Viscosity of alginate solutions at 25°C

○——○ Li-alginate　　×——× K-alginate
●——● Na-alginate　　△——△ NH_4-alginate

V　アルギン酸リチウム，ナトリウム，カリウム，アンモニウム各塩類溶液の粘性挙動

高分子電解質アルギンの粘性挙動は，等極性高分子粘度曲線とは趣を異にし，その異状性は η_{sp}/c—C 曲線に於て，濃度が稀薄になるに従つて η_{sp}/c 値が減少し，ある点で最小となり，ついで Staudinger[12] の所謂ゾル領域になるに従つて，再び漸次増大する。従つて，粘性挙動より，その分子或は粒子の分散状態を考察する多くの試みがある。

同一のアルギン酸より調製したアルカリ塩類の粘性挙動についての研究は少い。著者等は，同一のアルギン酸に由来する各種アルギン酸塩類水溶液中のアルギン分子の解離及び分散状態を知る一つの手段として，夫々の粘性挙動について，次の如き研究を行つた。

i　粘性測定法

各塩類の粘度の測定は，25±0.02°C の恒温槽内で，Ostwald 型粘度計を用い，測定の精確をきするために毛細口径の異なるもの4乃至5本組合せ，落

下秒数30乃至100秒前後で測定した。更に電解質として，2 N NaCl 溶液を各塩類液溶に等量添加し，分子の解離を抑制し，聚群形成を阻碍したものについても，その粘度を測定した。

ii 実験結果及び考察

各塩類の粘度の測定値を第4表，電解質を加えた時の粘度の測定値を第5表に示した。これらを図示したのが第5図及び第6図である。

Table 4. Viscosity of alginate solutions at 25°C

Li-alginate solution			Na-alginate solution			K-alginate solution			NH_4-alginate solution		
$C(g/dl)$	η sp	η_{sp}/c	$C(g/dl)$	η sp	η_{sp}/c	$C(g/dl)$	η sp	η_{sp}/c	$C(g/dl)$	η sp	η_{sp}/c
2.115$_9$	4615.71	2181.44	2.158$_6$	3363.43	1558.16	2.182$_5$	2375·64	1088.95	1.050$_2$	130.36	124.13
1.269$_5$	981.94$_9$	773.49	1.295$_1$	686.75	530.27	1.309$_5$	506.14	386.52	0.630$_1$	63.45	100.71
0.761$_7$	242.85$_6$	318.84	0.777$_1$	188.02	242.00	0.785$_7$	138.56	176.34	0.378$_0$	29.18	77.18
0.457$_0$	65.69	143.75	0.466$_3$	58.83	126.21	0.471$_4$	52.22	110.79	0.226$_8$	16.77	73.96
0.274$_2$	31.02	113.14	0.279$_7$	28.99	103.62	0.282$_8$	24.83	87.79	0.136$_1$	9.119	67.01
0.164$_5$	18.24	110.91	0.167$_9$	15.85	94.46$_3$	0.169$_7$	12.97	76.48	0.0816	6.042	73.98
0.0987	12.72	128.86	0.100$_1$	10.01	99.44$_7$	0.101$_8$	7.288	71.59	0.0486	3.976	81.13
0.0592	8.365	141.31	0.0604	6.388	105.74	0.0610	4.909	80.34	0.0294	2.815	95.74
0.0355	6.517	183.54	0.0363	4.147	114.40	0.0366	3.373	91.91	0.0176	1.911	108.36
0.0213	3.919	184.03	0.0218	2.706	124.44	0.0219	2.180	99.11	0.0106	1.123	105.94
0.0128	2.294	179.19	0.0131	1.700	130.28	0.0132	1.367	103.56	0.0063	0.858$_9$	138.34
0.0077	1.450	188.35	0.0078	1.075	137.31	0.0079	0.877$_6$	111.09	0.0038	0.461$_5$	121.46
0.0046	0.975$_7$	212.11	0.0047	0.690$_1$	147.08	0.0048	0.537$_6$	112.01	0.0022	0.239$_3$	104.05

Table 5. Viscosity of alginate solutions in 1 N NaCl solution at 25° C

Li-alginate solution			Na-alginate solution			K-alginate solution			NH_4-alginate solution		
$C(g/dl)$	η sp	η_{sp}/c	$C(g/dl)$	η sp	η_{sp}/c	$C(g/dl)$	η sp	η_{sp}/c	$C(g/dl)$	η sp	η_{sp}/c
1.058$_0$	283.18	267.572	1.079$_3$	311.49	288.690	1.091$_2$	235.51	215.816	0.525$_1$	29.92$_6$	56.998
0.634$_8$	70.21$_9$	110.115	0.647$_7$	66.13$_1$	102.132	0.654$_7$	66.93$_4$	102.220	0.315$_1$	9.389	29.797
0.380$_9$	21.72$_4$	57.034	0.388$_5$	17.81$_9$	45.867	0.392$_9$	17.72$_7$	45.119	0.189$_0$	3.680	19.472
0.228$_5$	7.239	31.684	0.233$_1$	5.986	25.680	0.235$_7$	6.140	26.052	0.113$_4$	1.604	14.147
0.137$_2$	3.038	22.148	0.139$_8$	2.741	19.603	0.1178	1.808	15.346	0.0680	0.769$_8$	11.304
0.0823	1.485	18.048	0.0839	1.298	15.503	0.0849	1.161	13.676	0.0408	0.386$_3$	9.461
0.0494	0.884$_3$	17.903	0.0503	0.660$_3$	13.139	0.0508	0.610$_3$	12.022	0.0245	0.214$_9$	8.775
0.0296	0.473$_8$	16.009	0.0302	0.366$_6$	12.139	0.0305	0.327$_3$	10.698	0.0147	0.114$_7$	7.805
0.0178	0.268$_2$	15.067	0.0181	0.207$_4$	11.458	0.0183	0.181$_3$	9.922	0.0088	0.055$_7$	9.334
0.0107	0.155$_9$	14.572	0.0109	0.126$_1$	11.619	0.0110	0.107$_3$	9.753	0.0053	0.032$_1$	6.065
0.0064	0.093$_6$	14.617	0.0065	0.075$_2$	11.575	0.0066	0.063$_3$	9.587	0.0032	0.022$_4$	6.991
0.0039	0.054$_1$	13.859	0.0039	0.049$_4$	12.628	0.0039	0.035$_8$	14.901	0.0019	0.013$_7$	7.199

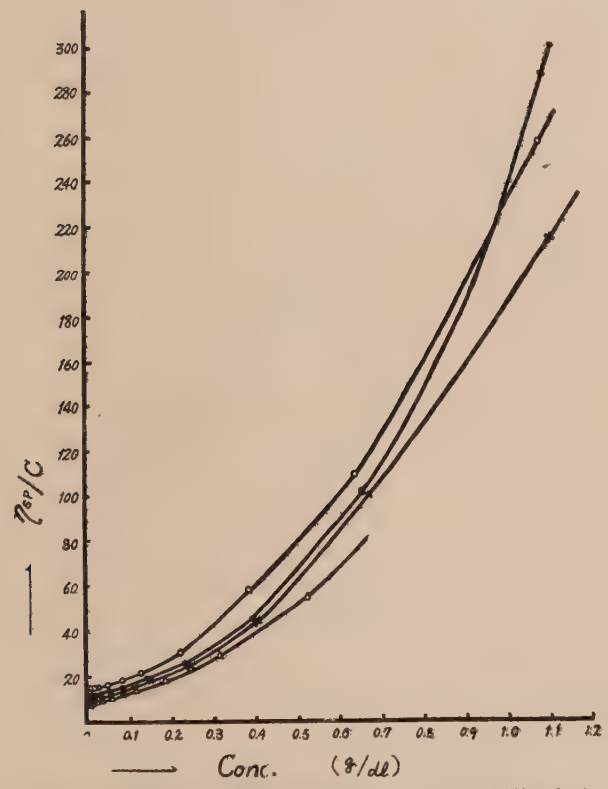


Fig. 6. Viscosity of alginate solutions in 1 N NaCl solution at 25°C

○ ——— ○ Li-alginate　　× ——— × K-alginate
● ——— ● Na-alginate　　△ ——— △ NH_4-alginate

Table 6. Values of the gradient (b) in highly concentrated alginate solutions at 25°C; $\eta_{sp}/c = [\eta]e^{b \cdot c}$

Alginate	b
Li-alginate	1.406
Na-alginate	1.354
K-alginate	1.283
NH_4-alginate	0.961

第5図のη_{sp}/c—C曲線より明らかなる如く，結合している陽イオンのイオン半径の小さいものから大きいものへと，即ちアルギン酸リチウム，ナトリウム，カリウム，アンモニウムの順に夫々の濃度におけるη_{sp}/c値が低くなつている。各塩類溶液のη_{sp}/cの限界濃度は，アルギン酸リチウム 0.23 (g/dl)，アルギン酸ナトリウム 0.17 (g/dl)，アルギン酸カリウム 0.15 (g/dl)，アルギン酸アンモニウム0.12 (g/dl) で，陽イオンのイオン半径が大きくなるにつれて，限界濃度前後のη_{sp}/c値の上昇度合が緩漫となり，限界濃度が稀薄溶液へと移行している。

構造粘性の発達しているゲル領域に於て，各塩類の$\log \eta_{sp}/c$と濃度Cとの関係は，第7図に示した如く，略直線となる。$[\eta]$は，アルギン酸リチウム 120，アルギン酸ナトリウム 83.3，アルギン酸カリウム 69.9，アルギン酸アンモニウム 53.2であり，濃度勾配(b)を図より求めると，第6表の如くなりアルギン酸リチウムが一番大きく，ナトリウム，カリウム，アンモニウムの順に小さくなつている。

以上のことから，アルギン酸リチウムに於ては，分子が比較的伸びた形で分散し，アルギン酸ナトリウム，カリウム，アンモニウムの順に，分子が屈曲し，絲毬状になる度合が大きくなり粘性も低くなるものと思われる。

電解質として，2 N NaCl を添加した場合の粘性は，電解質を加えることによつて，分子の周囲のイオン雲が消失され，解離基間の反撥力も失われて分子が Coil して粘性が著しく低下し無極性コロイドの性状を呈するものと考えられるが第8図より，$[\eta]$を求めると，第7表の通りである。第8図は，$\log \eta_{sp}/c$ in NaCl と濃度 C との関係を図示したのである。

同一のアルギン酸より調製せられた塩類であつても，其の陽イオンの異るに従つて，その粘性の変化の様

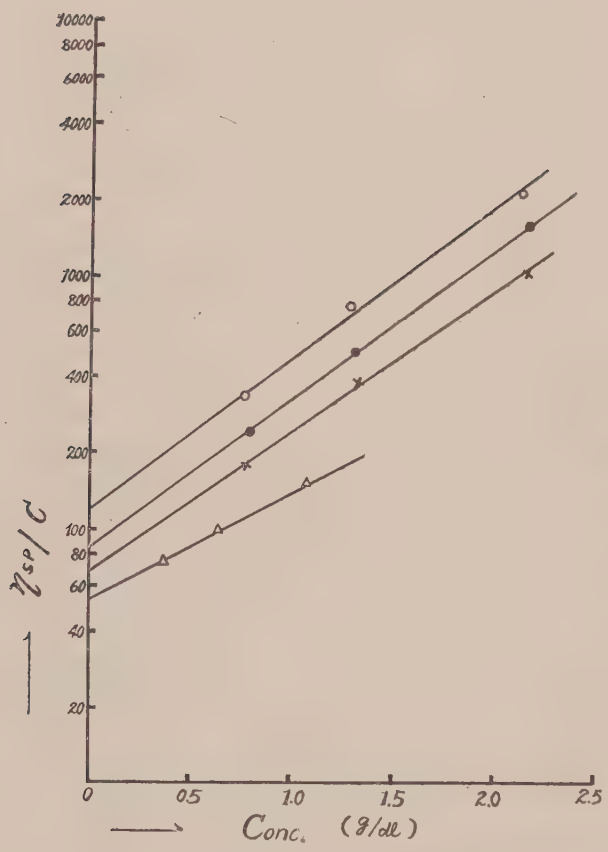


Fig. 7. Relation between η_{sp}/c and concentration at 25°C

○———○ Li-alginate　　×———× K-alginate

●———● Na-alginate　　△———△ NH_4-alginate

相も異り，Staudinger[14]の式によつて其の重合度を，電解質溶液中の粘性より求むるとすれば，各塩類毎に，夫々異つた重合度を有する結果が得られる。然し，果して事実重合度が異るか否かに就ては，即断をすることは出来ないのであつて，今後の研究に俟たねばならない。

桜田[13]は，log η_{sp}/c を log η_{sp}/c in NaCl に対して図示することによつて，形状指数（n）が求められ，その形状指数（n）は，一般に，線状分子に於て，屈曲の予想される場合には，nは1より小であつて，絲毬状に屈曲すれば0となり，更に，著しく屈曲して徴密な球に近づけば零となると述べている。電解質を加えた場合の〔η〕の値が，同一のアルギン酸より調製された各塩類に於て，夫々異る値を示すのは夫々の塩類の分散している分子の形状が異ると考えられるので，著者等は，香川[14]等の式に従つて形状指数（n）を算出した。

即ち log η_{sp}/c と log η_{sp}/c in NaCl との関係を図示すると，第9図の如き直線関係が得られる。この夫々の塩類より得られた勾配が，形状指数（n）を表わすので，第9図より，形状指数（n）を求めると，第8表の如くである。

Table 7. The intrinsic viscosity of alginates in the presence of electrolyte at 25°C

Alginate	〔η〕
Li-alginate	14.0
Na-alginate	10.7
K-alginate	9.30
NH_4-alginate	6.70

Table 8. Values of the gradient (n) of alginate solutions in highly concentrated solution at 25°C; log (η_{sp}/c)=K+n·log (η_{sp}/c)$_{1N\cdot NaCl}$

Alginate	n
Li-alginate	0.98
Na-alginate	0.52
K-alginate	0.40
NH_4-alginate	0.25

第8表から明らかな様に，n値がアルギン酸リチウムに於ては 0.98で，殆んど1に近く，その分子は殆んど伸び切つていると考えられる。アルギン酸ナトリウム，カリウム，アンモニウムに於ては，そのn値は，1より小であり，従つて大なる屈曲が考えられ，非常にからみ合つていて，絲毬状の発達の度合が大きいも

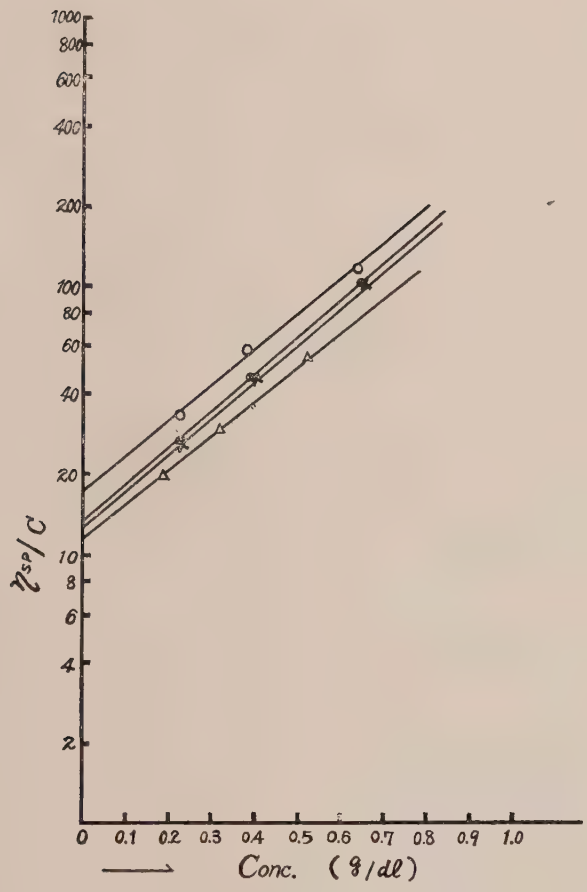


Fig. 8. Relation between η_{sp}/c in NaCl and concentration at 25°C

○———○ Li-alginate　　×———× K-alginate
●———● Na-alginate　　△—— —△ NH_4-alginate

のと思われる。

要　　約

同一のアルギン酸に由来するアルカリ塩類の比較研究のため，同一のアルギン酸より調製した，リチウム，ナトリウム，カリウム，アンモニウム各塩類についてその水分，酸度，粘性について研究し，次の結果を得た。

1）試料アルギン酸の灰分は0.2%で，この灰分を島津製作所研究部で分光定性分析をしてもらつた。その結果 Ca, Al, Cu, Ag, Sn, Si, Mg, Mn, Fe, Pb 等が含まれていることがわかつた。又Bartlet等によれば，As, Pb, Zn, Cu 等が含まれているという報告もあるが，これらの金属は，アルギン酸に，本質的に含まれているものか，或は調製過程中に薬品等から混入して，アルギン酸とカチオン交換で結合しているかについては明らかでない。

2）アルギン酸及びその塩類の水分は普通加熱による減量を以て表されるのであるが，100°C 或は 78°C に於てさえも数時間の加熱で著色する場合もあるので，加熱による化学的変化の有無について精密に検討する必要がある。本報に於ては，78°C で減圧下で5時間乾燥して，その減量を一応水分と見做した。

3）アルギン酸の酸度の測定は，高粘性アルギンに於ては，膨潤性が極めて大きいので，測定誤差の大きくならない程度で，少量の試料を用いることが望ましく，アルギン酸の酸度の測定に当つては，過剰の NaCl の如き電解質を添加して，滴定に際して膨潤したゲルの中に，アルカリの滲透を容易ならしめることが望ましいことが判つた。

4）同一のアルギン酸から調製した，リチウム，ナトリウム，カリウム，アンモニウム各塩類の水溶液の粘性を測定して，次の如き結論を得た。

各塩類共に，一般に高分子電解質の特異性を示すが，η_{sp}/c 値は，アルギン酸リチウムが一番高く，アルギン酸ナトリウム，カリウム，アンモニウムの順に低くなる。又限界濃度前後の η_{sp}/c 値の上昇度合は，アルギン酸リチウムが一番大きく，アルギン酸ナトリウム，カリウム，アンモニウムの順に小さくなり，限界濃度も此の順序で，稀薄溶液へと移行していることがわかつた。

電解質を加えた時の $\log \eta_{sp}/c$ in NaCl と $\log \eta_{sp}/c$ の値から，形状指数（n）を求めると，アルギン酸

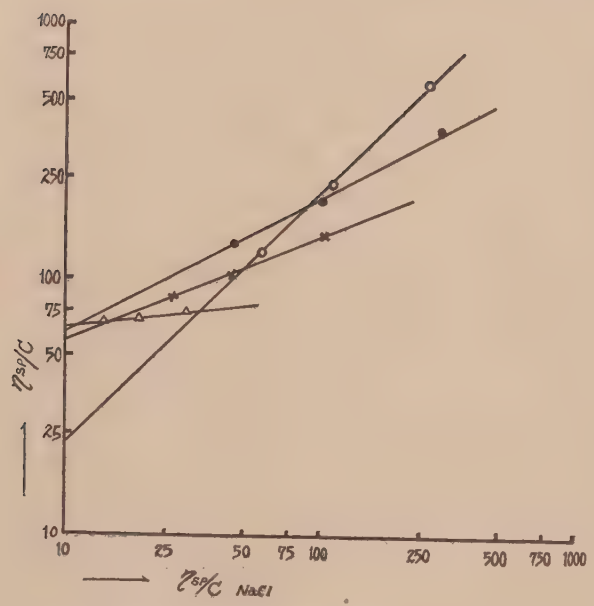


Fig. 9. Relation between η_{sp}/c and η_{sp}/c in NaCl at 25°C

○———○ Li-alginate　　×———× K-alginate
●———● Na-alginate　　△———△ NH_4-alginate

リチウム 0.98, アルギン酸ナトリウム 0.52, アルギン酸カリウム 0.40, アルギン酸アンモニウム 0.25で, アルギン酸リチウムが殆んど伸び切つた形であるのに反し, アルギン酸ナトリウム, カリウム, アンモニウムの順にn値は小さくなり, 屈曲にとみ絲毬状になる度合も大きくなることが考えられる。

各種の可溶性アルギン酸塩の水溶液に於ける粘性及び粘性から導き出された諸種の数値が, 夫々の塩類によつて異り, 而も, 夫々の値について, 其の値がアルギン酸と結合している陽イオンのイオン半径の大いさの順に配列せられることは, まことに興味深いことであると考えられる。

引 用 文 献

1) 高橋武雄 (1946). 海藻工業 p224. 東京; 産業図書株式会社.
2) 遠藤和良 (1951). 日　化 72, 968.
3) 清山哲郎 (1949～51). 工　化 52～54, 第1～11報.
4) 加藤健司 (1953). 北大水産彙報 4, 76.
5) 高橋武雄 (1951). 日　化 72, 292. 466.
6) 小黒美樹 (1954). 北大水産彙報 5, 277.
7) 鈴木　昇 (1953). 同　誌 4, 96.
8) Bartlet, J. C. & List, E. & Page, M. & Chapman, R. A. (1953). *Can. J. Technol.* 31, 146.
9) 三輪知雄 (1930). 日　化 51, 738.
10) Chanda, S. K. & Hirsr, E. L. & Percival, E. G. V. & Ross, A. G. (1952). *J. Chem. Soc.* 1952, 1833.
11) Fisher, F. G. & Dörfel. H. (1955). *Helv. Chim. Acta.* 302, 186.
12) Staudinger著. 吉田甲子郎訳 (1946). 有機膠質化学 p56, 東京; 東洋書館.
13) 桜田一郎 (1950). 高分子展望 3, 1.
14) 香川毓美・香田昌也 (1949). 工　化 52, 55.

結晶鯨 Pepsin

第2報 溶解度曲線・元素組成・至適pH並に安定度に就て

斎藤恒行・石原義雄
(北海道大学水産学部水産化学教室)

Crystalline Whale Pepsin

II. Solubility curve, elementary composition, opt. pH and stability

Tsuneyuki SAITÔ and Yoshio ISHIHARA

Abstract.

Some properties were observed of crystalline whale pepsin the preparaton of which was fully described in the previous paper[1]. The results obtained are summarized as follows:

1). By determination of its solubility curve, it was proved that crystalline whale pepsin was homogeneous.

2). The elementary composition of crystalline whale pepsin is lower in phosphorus and higher in sulfur content than swine pepsin.

3). Opt. pH in digestion of edestin, casein, hemoglobin and heat-coagulated egg white was estimated. Opt. pH in proteinase action (disappearance of substrate) is near 1.8 for swine pepsin and 3.0 for whale pepsin. Opt. pH in yield of peptides is near 1.8 for swine pepsin and 1.4-3.0 for whale pepsin.

Thus, similarly to fish pepsin, whale pepsin is active over a wide pH range in yield of peptide and very inferior to swine pepsin in proteinase action for heat-coagulated egg white.

4). Pepsin dissolved in solution at 37° C. is most stable at pH 2.2-5.0 for whale and at pH 4.0-5.0 for swine.

Decreasing the hydrogen ion concentration below pH 5.0 causes in the cases of both whale and swine pepsin a very rapid increase in the rate of destruction of the enzymes.

Increasing the hydrogen ion concentration above the stable pH range results in a slow increase for swine and a very rapid increase for whale pepsin in the rate of decomposition of the proteins.

緒言

前報[1]に於て鯨胃組織から結晶 pepsin の独自の調製法とその specific activity, 結晶形の polymorphism 等に就て報告したが，ここに標品の溶解度曲線を測定して前回の電気泳動的な判定と共にその単一性を証明，更に元素組成及び二，三基質に対する至適 pH 並に pH と安定度との関係等に就て結晶豚 pepsin との比較を行つた。

鯨 pepsin の至適 pH に就ては先に鯨胃粘膜塩酸浸出液[2]の観察を行つたが，既往の pepsin の至適 pH に関する報告は極めて多く，陸上哺乳動物[4)-19)]に於ては pH 1.4~2.0 (主として1.8附近)，魚類[20)-28)]に於ては 3.0 附近 (唯 Vonk[11)12)]のみがサメ類に対し至適 pH 2.2 を与えているが)とされている。元来protease の至適 pH は基質及び緩衝液の種類，作用時間並に温度，酵素量等の反応条件により多少異るので，之等を同一にして豚・鯨両 pepsin の至適 pH を観察したが，哺乳動物である鯨の pepsin が種々の点に於て，魚類 pepsin に類似する結果を得た。

又安定度が強酸性域に於て極めて劣る事，元素組成に於てP含量少くS含量大なる事が認められ之等の点

に於ても魚類 pepsin に類似する傾向を示す。

実 験 の 部

試料及び方法

鯨 pepsin ：前報[1] の鰯鯨（*Balaenoptera borearis* LESS.）の結晶 pepsin を3回再結し電気泳動的に均一なもの，

豚 pepsin ： Worthington Chemical Sales Co., New Jersey, U. S. A. 製のもの3回再結，両者共に〔PU〕$^{Hb}_{mg.P.N.}$ = 0.22～0.23.

Edestin ： 麻実より Bailey法[3] により調製した結晶 edestin を1回再結。

Casein ： Merck 製 casein (acc. to Hammarsten)。

Hemoglobin ： Anson 法[29]に従つて牛・鯨・鰊の生鮮血液より調製した。

溶解度曲線測定： Northrop[30][31] に準じて行つた。溶媒は pH4.8 0.08M acetate buffer-0.2sat. $MgSO_4$ 溶液を使用。上記鯨 pepsin の新に三回再結したもの 500mg を溶媒 4ml. に懸濁し内径15mmの遠心沈澱管内で之の½の直径の硝子棒で22°C20分間攪拌後遠心，上清の窒素を micro-Kjeldahl 法で定量，之を4回繰返して溶解度一定となつた沈澱を遠心分取して供試。溶解平衡は 22°C 20分間攪拌と，30°C 20分間攪拌後22°C24時間放置の両法を併用した。

至適 pH 測定： activity 測定には種々の見地より基質の消失速度（proteinase 作用）と反応生成物量（proteinase 作用により生成した "primary products" に更に二次的分解が加わる）の測定の2方法を併用した。

a） proteinase 作用測定—消化液に蛋白沈澱剤を加え，対照と比濁を行う方法であるが，沈澱剤には NaCl,[32], $MgSO_4$[33], sulfosalicylic acid[34], trichloracetic acid[15]（以下TCAと略記）等種々提案されているが，ここではTCAを用い主として Buchs[15]（1953）と Kleinmann[34]（1930）に従つて次の様にして測定した。0.2%各種蛋白質透明溶液2.5ml に HCl-citrate buffer 5ml を加えて pH を調節し pepsin を添加（1% stock solution を適宜稀釈して使用），35°C 1時間消化後反応液 2.0ml に就て0.5% *Gummi arabicum* 液 2.0ml, 及等量の TCA 溶液（最終濃度10%の場合は20%，最終濃度3%の場合は6%TCA）を加えて生ずる沈澱を対照と比濁し各pH に於る未消化液の混濁度を 100%とした基質消失量を分解度とする。凝固卵白に対しては局方試験[11]に準じ卵白粒消失の時間と基質重量の減少度を測定。

b） 反応生成物量測定—前報の如く Anson[29] 法に従つて消化液のTCA溶存部の Folin 値を測定。

pH 測定：Beckmann pH-meter（H-II型）及島津製（GU-2型）pH-meter を併用。

安定度測定：HCl 及び Mc Ilvaine の citrate-phosphate buffer を調節液とした各種 pH に於ける pepsin 溶液を37°C24時間放置後の残存 activity を Anson の Hb-method[29] で測定。

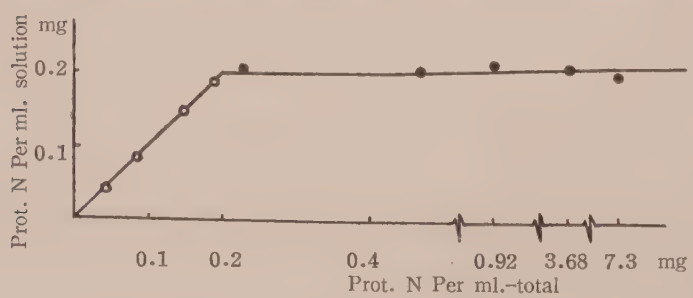


Fig. 1. Solubility curve of whale pepsin in 0.2-saturated $MgSO_4$ 0.08 M pH 4.8 acetate buffer at 22° C

実験結果及び考察

I．溶解度曲線

蛋白質の純度判定には種々の方法があるが少くもその2種以上の方法で均一なる事が証明せられなければ信頼性は薄い。鯨 pepsin の電気泳動的な均一性は前報[1] で示したが，ここに得られた溶解度曲線も（第1図）そ

の均一性を示している。溶媒には豚 pepsin に比し溶解度可なり小なる為 0.2 sat.-$MgSO_4$ を用いた。

II. 元 素 組 成

3回再結した溶解度一定且つ電気泳動的に均質な試料に就き，更に電気透析を行い（150volt 0.1mA まで）凍結乾燥に付したものを供試した。既往の豚・鮭両結晶 pepsin の 元素組成と対比すると第1表の如くである。

Table 1. Elementary composition of various crystalline pepsin

Pepsin	N	C	H	S	P	Ash
Swine[30]	15.15	52.3	6.66	0.88 (0.94[31])	0.058 (0.09[31])	0.40
Salmon[27]	15.2	51.9	6.48	1.58	0.031	0.08
Whale	15.89	51.8	6.24	2.53	0.011	0.23

る。之によると鯨 pepsin は鮭 pepsin に類似しS含量多くP含量少く然もその傾向を一層大にしている。methionine・cystine 等含Sアミノ酸の含量が多いものと考える。P含量少いのは電気泳動的挙動（豚pepsin は pH1.0以下に於ても尚「－」荷電を示すのに対し ——構成アミノ酸の他に燐酸イオンの存在の為と推測されている——鯨 pepsin では pH3.2附近に於て明かに「＋」荷電に転ずる）が鯨・豚両 pepsin の間に相異が認められる事に関係あるものと考える。

III. 至 適 pH

至適 pH は酵素の重要な性質の一つであるが古くして新しい問題と考える。pepsin に就ても Sørensen[4]（1909），Northrop[7]（1921）を始め多数の研究者により測定されているが最近再び結晶又は市販 pepsin に就て至適 pH が種々の角度から観察され，Merten *et al.*[16]（1952）及び Buchs[15]（1951）一派は2 optima の存在からして cathepsin 共存を主張するのに対し Heinrich[17]（1953），Tolckmitt[19]（1954）並に Taylor *et al.*[18]（1955）等は之を否定し実験条件により出現する現象で pepsin 本来の性質なりとし種々論議が闘わされている。

この問題に就ては著者等は proteinase 作用の至適 pH3.0 を示す鯨 pepsin は魚 pepsin と共に pepsinの "category" に属し然も豚等の陸上哺乳動物の pepsin とは異る型のものと考える。即ち H_2S・HCN 等の影響を受けず，強酸性溶液に於ても大きな蛋白分解能を示し且分解生成アミノ酸は豚 pepsin と類似するが電気泳動的挙動・基質特異性・等電点等を明かに異にしている。

ここに於て稍々詳細に至適 pH を観察して見た。酵素の至適 pH は基質及び buffer の種類・作用時間並に酵素量等により多少相異を示す事は良く知られている所であるが，中でも activity 測定法による差異は大きい。Rona *et al.*[43]（1930）はこの点に関し比濁法と適定法とでは分解産物の影響を異にして基質の減少度と分解産物の増量とは必ずしも比例しない事を示している。peptide 鎖開裂を伴わない単なる "dis aggregation" と，その "primary products" を二次的に分解して peptide 鎖開裂を与える作用とを区別すべきものと考える。この点小野等[42]（1954）も amylase に就て大分子の分解生成物の定量と小分子の分解生成物の定量とでは Ca の阻害度を異にする事を示唆している。

之等を考慮して既往の pepsin の至適 pH に関する文献を通覧すると，豚等一般哺乳動物の至適 pH は Sørensen 以来[4-19] 主として1.8～2.0であるに対し，銀マス[20]，鮪・鰯[21]，鰹[22]，姫マス[23]，鰻[24]，サメ[25]，パイク[26]，鮭等[27,28]の魚類 pepsin は pH3.0 とされている。（唯Vonk[11]（1927）のみがツノザメ（*Acanthias vulgaris*）に対して pH2.2～2.3 と豚に近似した値を与えている）。哺乳動物である鯨の pepsin が環境を同じくする魚類 pepsin とこの点に於て如何なる関係を示すかは興味を惹く所であるが，edestin・casein・hemoglobin・熱凝固卵白等に対する proteinase 作用（基質消失度）と Anson 法による分解生成物量の測定（TCA—溶性 peptide 生成能）による至適 pH を夫々豚・鯨両 pepsin に就て同一条件の下で観察した。

A. Proteinase 作用の至適 pH

一般には 20% TCA を等量反応液に加えて最終濃度 10% の TCA 沈澱性蛋白粒子の消失度を測定するが，ここでは Anson の Hb-method と対比する為に最終濃度 3% の TCA 沈澱性の比較的大分子の蛋白粒子に対する proteinase 作用をも併せ観察した。

i.) Edestin：第 2 図-a, b

鯨 pepsin は 3%及び10%TCA沈澱性蛋白粒子の両者に対して至適 pH3.0 を示すに対し，豚 pepsin は比較的大分子の蛋白質に対する proteinase 作用は 1.8 で，稍々低分子の蛋白粒子までを対象とする時は，1.8～3.0 と 'broad curve' を与える。但し，遊離アミノ酸生成量を見ると pH1.8 に於て遙かに多い事を示す。activity は両 pepsin 類似す。

ii.) Casein：第 3 図-a, b

edestin の場合と反対に，豚 pepsin は 3%TCA 沈澱性・10% TCA 沈澱性両蛋白粒子に対して同一の至適 1.8 を示すのに対して鯨 pepsin は後者に対し 'broad curve' を与える。この場合も遊離アミノ酸の生成量は pH3.0 に於て遙かに多い。即ち proteinase 作用が 'broad curve' を与える時でも豚 pepsin は 1.8 鯨 pepsin は 3.0 に於て二次的分解の peptidase 作用大である。之に関する詳細は次回に譲る。activity は鯨 pepsin の方約 30% 劣る。

iii.) Hemoglobin：第 4 図-a, b

3%TCA沈澱性・10%TCA沈澱性両蛋白粒子に対して豚 pepsin は至適 pH1.8～2.0，鯨 pepsin は 3.0 を与えるが，両 pepsin 共に edestin, casein の場合よりも作用域拡大しているのを見る。activity は 3%TCA 沈澱性 hemoglobin に対しては両者近似するも 10%TCA 沈澱性 hemoglobin では鯨の方約30%劣る。

iv.) 熱凝固卵白：第 5 図

凝固卵白に対する鯨 pepsin の proteinase 作用は極めて悪く魚 pepsin に類似す。[25 26] 即ち $(PU)^{Hb}_{mg.P.N.}$ 同一のものを用いて豚 pepsin では 50°C 1 時間で卵白粒の液化完了する場合鯨 pepsin では10時間放置しても一部液化のまゝ進行せず大量の卵白粒残存す。豚の5～7倍の大量を使用して始めて液化完了するに至る。然し乍ら，二次的分解は比較的 activity 大で次の Folin 青色価の測定では豚の 1/2 程度を示す。即，豚の 'stepwise' 型に対し 'one by one'（all or none）型に近似の分解型式を取る。この場合鯨 pepsin が小差を以て 1.8 に至適 pH を示す事が注目される。之は Zein に於ても認められる事で，之等不溶性蛋白に対しては鯨 pepsin は作用力遙かに豚に劣り且つ至適 pH が小差で 1.8 え移行する。

B. 反応生成物量（Folin 青色価）測定による至適 pH

之は主として proteinase 作用による 'primary products' の二次的分解の至適 pH である。この測定法による時は鯨 pepsin は何れの蛋白質に対しても約1.0～3.0 の 'broad curve' を与え proteinase 作用の時の様な peak を示さない。同一TCA 3%濃度で proteinase 作用の至適 pH3.0 に於ける peak が Folin 青色価測定で現われないのは，鯨 pepsin の proteinase 作用が単なる 'disaggregation' が主で一部 tyrosine 等が 'mask' されたまゝに放置されているのに対し豚 pepsin の方は 'disaggregation' と 'masked tyrosine' を解放する二次的分解作用が平行して行われる為に両測定法（基質減少度と反応生成物量測定）による至適 pH が一致するものと考える。前述の Rona 等[13]も之等両測定法による結果の必ずしも平行せざる事を観察してる。

i.) Edestin：第 6 図

豚 pepsin は至適 pH1.8 を示すのに対し鯨 pepsin は 1.5～3.0 の 'broad curve' を与える。activity は鯨の方約 20%大。

ii.) Casein：第 7 図

豚 pepsin は至適 pH1.8 であるのに対し鯨 pepsin は 1.5～3.0 を示す。activity 豚の方約10%大。

iii.) Hemoglobin：第 8 図-a, b

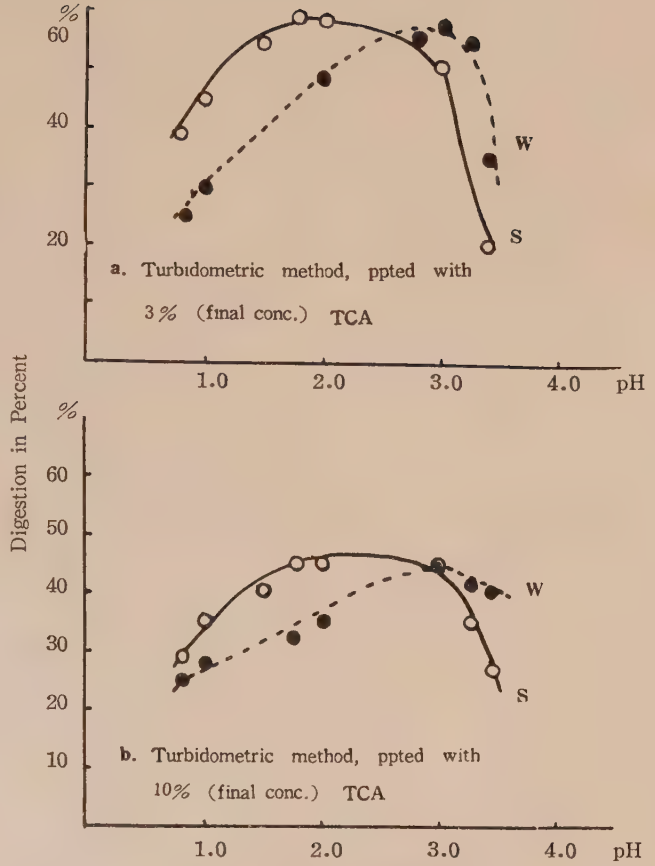


Fig. 2. Digestion of edestin with whale or swine pepsin at various pH, 35°C, 60 min.
Curve W : whale pepsin Curve S : swine pepsin

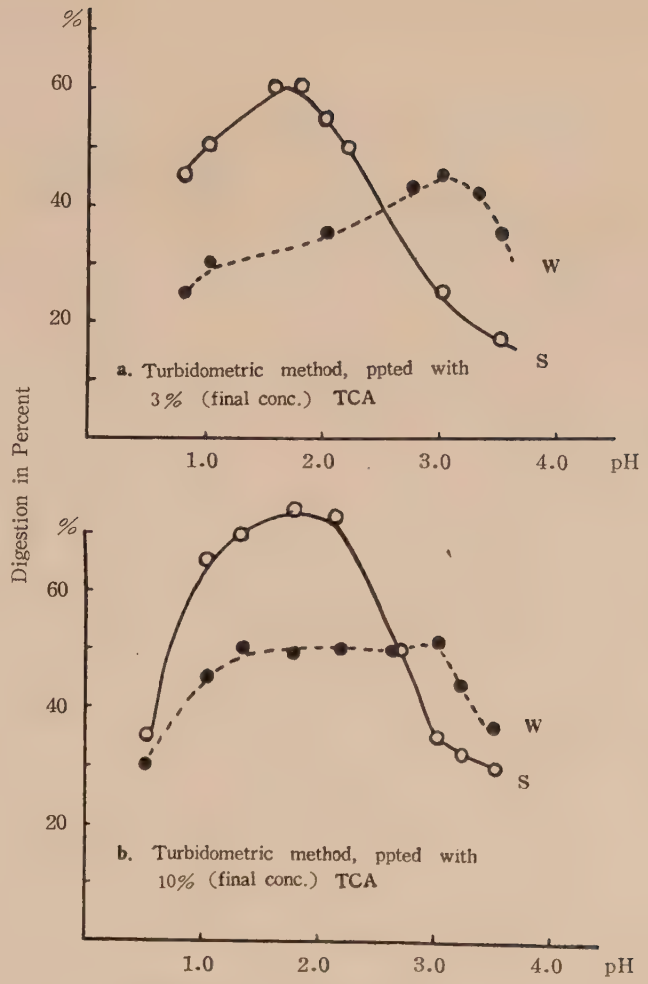


Fig. 3. Digestion of casein with whale or swine pepsin at various pH, 35°C, 60 min.
Curve W : whale pepsin Curve S : swine pepsin

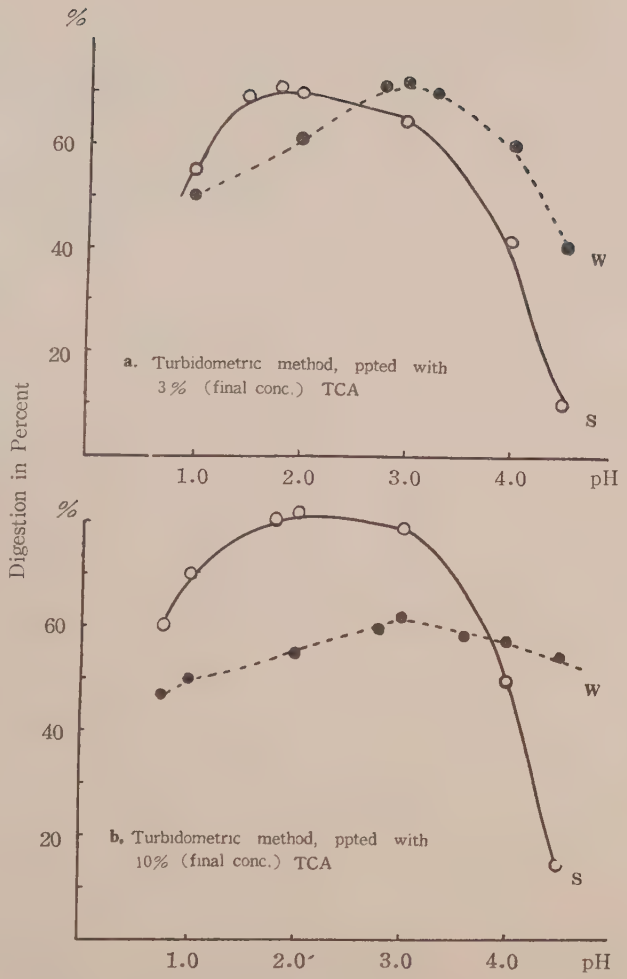


Fig. 4. Digestion of hemoglobin with whale or swine pepsin at various pH, 35°C, 60 min.
Curve W : whale pepsin Curve S : swine pepsin

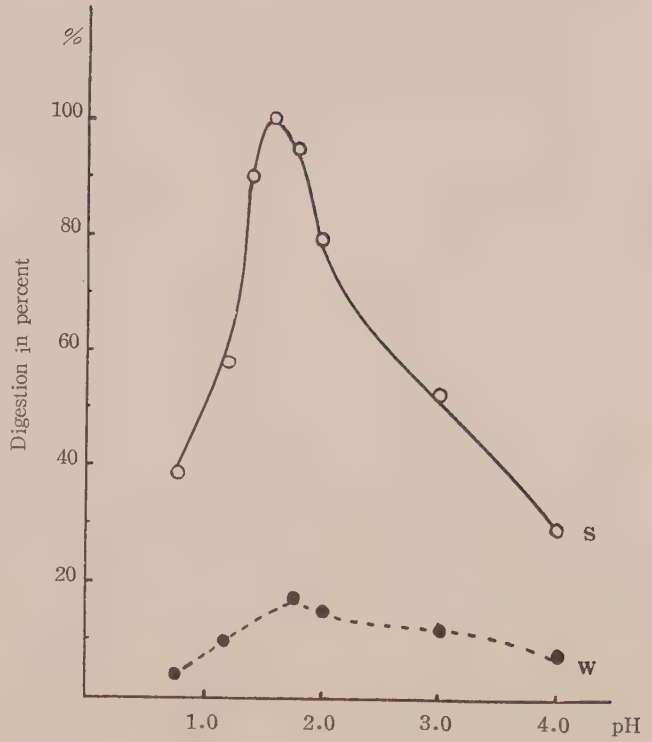


Fig. 5. Digestion of coagulated egg-white with whale or swine pepsin at various pH, 50°C
Activity according to the Japanese pharmacopoeial assay
Curve W : whale pepsin Curve S : swine pepsin

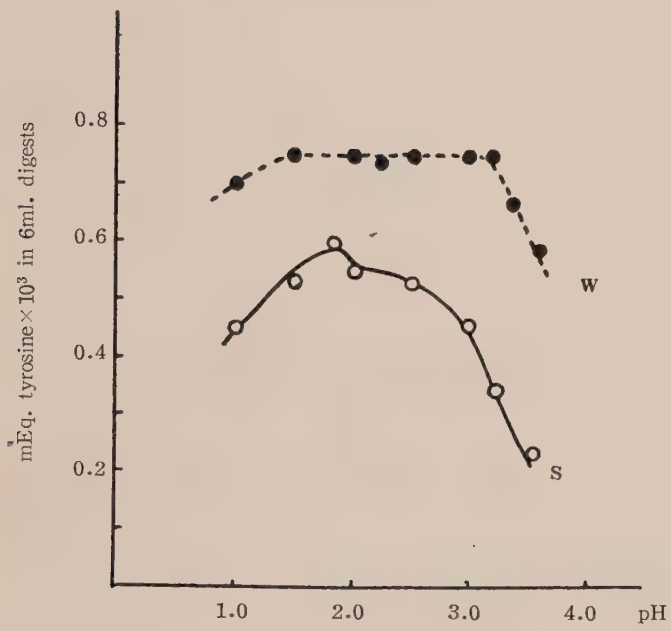


Fig. 6. Dependence of initial rate of digestion of edestin on pH
Estimation of peptide formation (Anson's Folin–color method[29]) at 35°C, 10 min.
Curve W : whale pepsin Curve S : swine pepsin

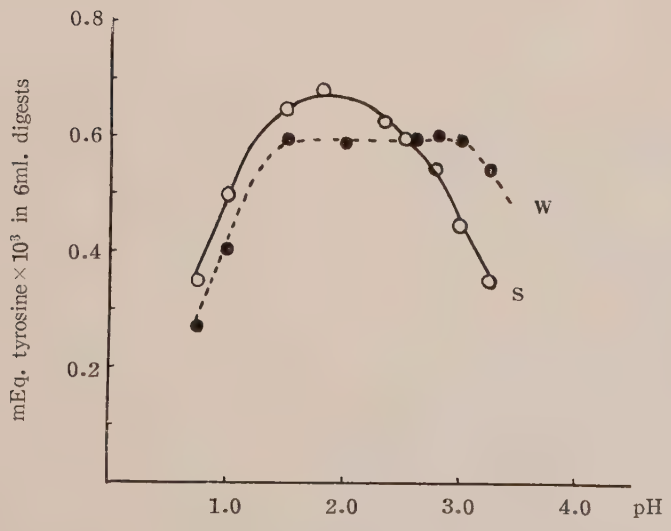


Fig. 7. Dependence of initial rate of digestion of casein on pH
Estimation of peptide formation (Anson's Folin–color method[29]) at 35°C, 10 min.
Curve W : whale pepsin Curve S : swine pepsin

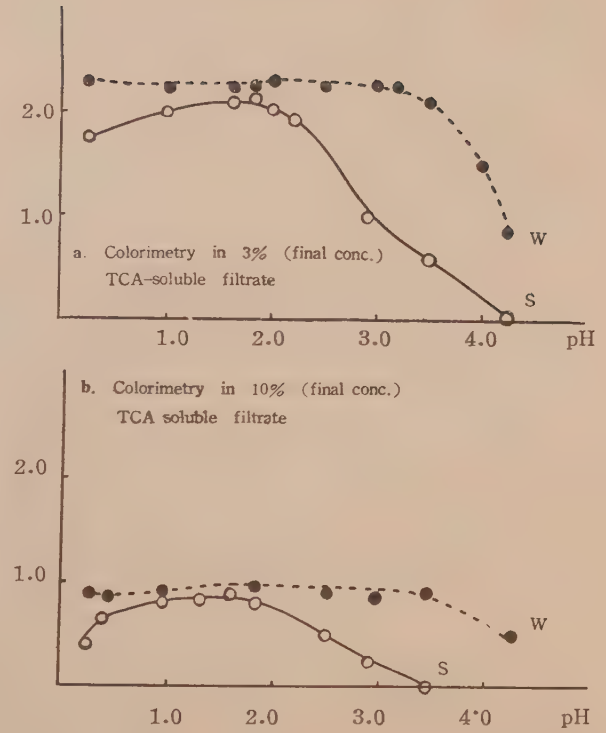


Fig. 8. Dependence of initial rate of digestion of bovine Hb on pH
Estimation of peptide formation (Anson's Folin-color method) at 35°C, 10 min.

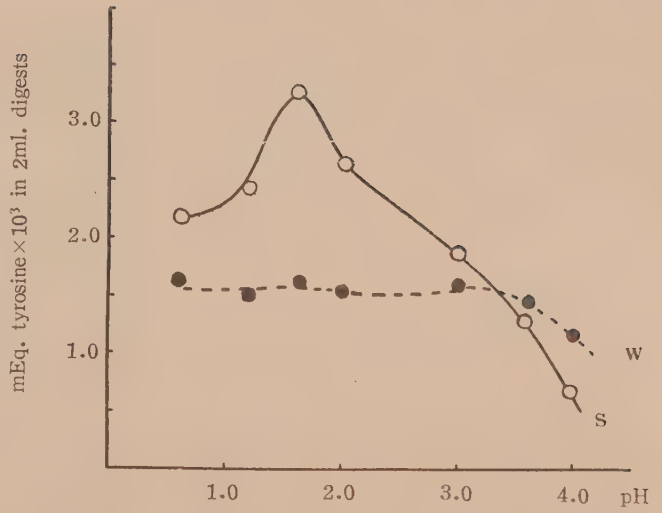


Fig. 9. Digestion (acc. to the Japanese Pharmacopeial assay) of coagulated egg-white with whale or swine pepsin at various pH, 50°C, 60 min.
Colorimetry in 3% TCA-soluble filtrate (Anson's Folin-color method)
Curve W : whale pepsin Curve S : swine pepsin

Proteinase 作用の至適 pH 測定の場合と同様にして 3% と 10% の TCA 濃度の差の影響を検討したが，図に示す様に Folin 青色価測定による時は両者の間に傾向の差は認められない。(edestin・casein の場合も同じく認められなかつた)。即ち除蛋白の TCA 濃度が 3% 及び 10% の何れの場合であつても鯨 pepsin は 0.6～3.4，豚 pepsin は前者に於て 1.8 後者に於て 1.6 の至適 pH を示す。両 pepsin 共に他蛋白よりも作用域が（特に酸性側に於て）拡大するのを見る。activity 両者相似る。

尚鯨 pepsin の魚 hemoglobin に対する特別の消化能があるものと考えて比較したが反つて 豚 pepsin に劣る結果を示した。鯨 hemoglobin に対しては豚に優る activity を示す。牛・鯨・鰊の各種 hemoglobin に対する消化能は第 2 表の如くである。又至適 pH 曲線も測定したが牛・鯨・鰊の hemoglobin の間に傾向の差は認められなかつた。

Table 2. Digestive power of whale and swine pepsin for various hemoglobin
Activities were estimated by Anson's Hb method[29].

Pepsin	Beef Hb		Herring Hb		Whale Hb	
	mEq. tyrosine in 6ml. digests	Ratio	mEq. tyrosine in 6ml. digests	Ratio	mEq. tyrosine in 6ml. digests	Ratio
Swine	2.20×10^{-3}	100%	1.87×10^{-3}	85%	2.21×10^{-3}	100%
Whale	2.19×10^{-3}	100	1.52×10^{-3}	70	2.61×10^{-3}	120

iv.）凝固卵白：第 9 図

豚 pepsin は明瞭に pH1.6 に peak を示すのに対し鯨 pepsin は 0.6～3.6 の間で差なし。activity 鯨は豚の約50%。

以上 proteinase 作用（基質減少度）はedestin・casein・hemoglobin 共に豚 pepsin に在りては至適 pH 1.6～1.8に対し（10%TCA 沈澱性 edestin に於ては 1.8～3.0），鯨 pepsin に於ては 3.0（10%TCA 沈澱性 casein に対しては 1.8～3.0）で且つ pH3.0～4.0 に於る分解能が常に豚より大である。凝固卵白に対する鯨 pepsin の proteinase 作用極めて劣ると共に至適 pH1.6 へ移行する事は注目される。但し，この場合の分解能の pH による差は僅小である。

之に対し 'primary products' の二次的分解能を測定する時は，豚 pepsin は上と同様至適 pH1.8 であり，鯨 pepsin は 1.4～3.0 と顕著な 'broad curve' を与え peak を示さない。之は鮭 pepsin[27]も同様にして Norris & Elam が種々検討している所であるが，魚・鯨両 pepsin 自体の性質と目される。之は両 pepsin の凝固卵白液化力の極めて劣る事と併せ考えて興味深い。pH1.8 及び 3.0 に於ける豚・鯨両 pepsin の各種蛋白質の分解生成遊離アミノ酸に就ては次の機会に譲る。

Ⅳ. 鯨胃内部の pH

魚胃内の酸性が哺乳動物同様塩酸による事は van Herwerden,[39] Ringer[14] により，又鯨胃に就いても同様に高田[40]により証明されている所であるが，胃内部の pH は必ずしも pepsin の至適 pH とは一致しない。之に就ては Vonk[11]（1927）が各種動物に就て詳細に測定しているが，ツノザメが pH 2.3～3.5 を示してその pepsin の 至適 pH に接近しているのみで他は一般に pepsin の至適 pH より遙かに高い。鮭胃に就て遡河前（石狩川沖）摂食時は pH 5.0，11月遡河（千歳川採卵場）して来たものは pH 6.8 を経験したが，この様に食物摂取の状態にも関係し，一般に消化中は酸度上昇し，食物存在せぬ時は中性に近づくものとされている。今迄に 6 例の鯨胃内容の酸度測定を行つたがイカを消化中の鰛鯨に就ての結果を第 3 表に示す。前報で示した如く鯨では第 2 胃が pepsin 主要分泌腺胃であるが，塩酸分泌腺は第 3 胃の方が第 2 胃よりも多い[40]のであるが，第 2 胃が一番酸度高く少差で第 3・4 胃が之に次ぎ腺胃で無い第 1 胃は中性に近い。胃内空虚の事も間々あるがこの時は 6.2 附近（第 2 胃）に酸度低下す。又表示の如く鮮度低下によりても pH の上昇

Table 3. pH of contents of whale stomach (Fin-whales, caught at the coast of Akkeshi, Hokkaido, in 1952, Oct.)

A. Relation between grade of freshness and pH in 2nd chamber of whale stomach

	*Grade of freshness	pH in 2nd stomach
Fin-whale (44 feet, ♂)	90%	5.0
〃 (48 feet, ♀)	80	5.2-5.4
〃 (42 feet, ♀)	60	5.8-6.2

* cf. Previous report[1]

B. pH of gastric contents in various chambers of the same fin-whale

Stomach	pH	Contents in stomach
1st Chamber	6.4	undigested squids
2nd 〃	5.0	half-digested squids
3rd 〃	5.2-5.4	black-reddish mushy digests
4th 〃	5.2-5.4	〃 〃

Table 4. Stabilities of crystlline whale and swine pepsin at different pH values, 37°C 24 hours. Activities were estimated by Anson's Hb method[2].

Pepsin	Folin color of TCA filtrate \ pH	0.6	1.0	1.4	2.2	2.6	3.0	4.0
Swine P. (control 0.345)	Measured [OD]	0.255	0.278	0.322	0.330	0.333	0.347	0.410
	Corrected [OD]	0.185	0.208	0.252	0.260	0.263	0.277	0.340
	Remaining activity %	53.3	60.3	73.0	75.3	76.2	80.3	98.8
Whale P. (control 0.340)	Measured [OD]	0.070	0.070	0.250	0.409	0.407	0.409	0.406
	Corrected [OD]	0	0	0.180	0.339	0.337	0.339	0.336
	Remaining activity %	0	0	52.9	99.7	99.1	99.7	98.8

5.0	5.2	5.4	5.6	6.0
0.413	0.389	0.219	0.109	0.070
0.343	0.319	0.149	0.039	0
99.4	92.5	43.1	11.3	0
0.405	0.368	0.190	0.091	0.070
0.335	0.298	0.120	0.021	0
98.5	87.6	35.3	6.1	0

を見るので生存時は pH 5.0 よりも可なり酸度大なるものとも推定せられるが鯨胃 pepsin の至適 pH 3.0乃至は 1.6～3.0 と比較して可なりの差を示す。前述の Vonk は諸種動物の胃内 pH とその pepsin の至適 pH との関係から種々の group に分類しているが，鯨はその第2 group に属し丸呑みした魚類・プランクトンの胃壁密着部は見掛けよりは可なり低い pH に置かれるものであろうとも考えられる。又 pepsin 分解物が低

級なるに従つてその至適 pH 域が拡大される事が知られているので，第1次の分解が済んだ後はこの程度の高い pH でも相当消化作用が進行するものであろう。

V．pH と安定度

Pepsin の pH と安定度との関係は豚に就て Northrop[35)36)]並に田沢[37)]，魚に就て Norris *et al.*[38)]が観察している。豚 pepsin は蛋白消化至適 pH 1.8 附近に対し pH 5.0 附近が一番安定で，之のアルカリ側は急速に activity を喪失するが，その酸性側は極めて緩慢な低下を示す。且 anion の種類の影響が無い事も認められているが，ここに同一条件で豚・鯨両 pepsin の pH と安定性の関係を比較して見た。測定結果は第4表の如くである。即ち 37°C24 時間放置で豚では pH 4～5，鯨に於ては pH 2～5 と鯨の方が安定域が広い。但し安定域のアルカリ側は両 pepsin 共に急速に失活するが，酸性側では豚の緩慢な activity 低下であるのに対し鯨 pepsin はそのアルカリ側同様極めて速かに既に pH 1.0 に於て完全に失活して了う。

室温放置の場合，鯨胃粗浸液では150時間位までは pH 1.0 に於て activity がそのまゝ保持されるが，結晶標品では24時間で10%，48時間で30%，200時間では90%が失活する。この様に pH 1.0 附近以下で急速に activity を喪失して了う事は魚 pepsin[39)]に類似した性質である。豚 pepsin とは構成アミノ酸組成及びその配置を異にしている為と考える。

要　　約

1．結晶鯨 pepsin の溶解度曲線を測定しその均質なる事を証明した。

2．元素組成は豚 pepsin よりP含量少くS含量大で魚 pepsin に類似する傾向を示す。

3．edestin, casein, hemoglobin, 凝固卵白に就て基質減少度（nephelometry），peptide 生成量（Ansonの Folin 青色価測定）の両方面より至適 pH を測定し，前者の場合豚 pepsin は至適 pH 1.8 附近であるのに対し鯨 pepsin は 3.0，後者の場合豚 pepsin は同様 1.8 附近であるのに対し鯨では 1.4～3.0 と魚 pepsin と同様 'broad curve' を与えて peak を示さない。即鯨 pepsin では proteinase 作用と peptide 生成の二次的分解とが平行しない。又鯨 pepsin は凝固卵白に対する proteinase 作用が魚 pepsin 同様極めて劣る。

4．鯨 pepsin の安定 pH 域は豚の pH 4～5 に対し 2～5 と広く且つこの安定域の酸性側に於て魚 pepsin 同様急速に activity を喪失する。対照の豚 pepsin では安定域のアルカリ側では急速に失活するが酸性側に於ては極めて緩慢な activity の低下を示すに過ぎぬ。

本実験遂行に当り御指導・御鞭撻を賜つた北海道大学農学部故高岡道夫教授中村幸彦教授，又元素分析を行われた東京工業試験所大泉健二郎氏，武田薬品株式会社研究所に深甚なる感謝の意を表す。
本研究費の一部は文部省科学研究費に依つた。併せて謝意を表す。

文　　献

1．第1報，斎藤・石原(1956)．日農化 30(7)，426.
2．高岡・石原・三輪・豊田(1948)．科学 18，411.
3．Bailey, K.（1942）. *Biochem. J.* 36，140.
4．Sørense,n S. P. L.（1909）. *Biochem. Z.* 21，131.
5．Michaelis, L.（1910）. *ibid.* 28，1.
6．Okada.（1916）. *Biochem. J.* 10，126.
7．Northrop. J. H.（1921）. *J. Gen. Physiol.* 3，211.
8．————————（1923）. *ibid.* 5，263.
9．Rona, P.（1924）. *Biochem. Z.* 150，444.

10. Ege, R. (1925). *Z. physiol. Chem.* 143, 159.
11. Vonk, H. J. (1927). *Z. vergl. Physiol.* 5, 445.
12. ——— (1929). *ibid.* 9, 685.
13. ——— (1939). *Ergeb. Enzymforsch.* 8, 55.
14. Ringer, W. E. (1915). *Z. physiol. Chem.* 95, 195.
15. Buchs, S. (1953). *Biochem. Z.* 325, 44.
16. Merten, R., Schramm, G., Grassmann, W., & Hannig, K. (1952). *Z. physiol. Chem.* 289, 173.
17. Heinrich, W. D. (1953). *Biochem. Z.* 323, 469.
18. Taylor, W. H. & O' Brien, J. R. P. (1955). *Biochem. J.* 61, ii.
19. Tolkmitt, W. (1954). *Biochem. Z.* 325, 389.
20. 大島 (1925). 水産学雑 28, 17. 札農林報 16, 307.
21. (1926). 同 誌 29, 17. 同 誌 18, 59.
22. 島田 (1935). 日水誌 4, 9.
23. 大谷・中井 (1937), 日水誌 6, 45.
24. 高橋・広沢 (1936), 同 誌 5, 109.
25. Bodansky, M. & Rose, W. C. (1922). *Am. J. Physiol.* 62, 482.
26. Rakoczy, A. (1913). *Z. physiol. Chem.* 85, 349.
27. Norris, E. R. & Elam, D. W. (1940). *J. Biol. Chem.* 134, 443.
28. 高岡・石原 (1950). 日化 71, 324.
29. Anson, M. L. (1938). *J. Gen. physiol.* 22, 79.
30. Northrop, J. H. (1930). *ibid.* 13, 774.
31. ——, Kunitz, M. & Herriott, R. M. (1948). *'Crystalline Enzymes'* 2nd ed., 295p. Columbia Univ. Press, New York.
32. Fuld, E. & Levison, L. A. (1907). *Biochem. Z.* 6, 473.
33. 大島 (1923). 札農林報 14, 373.
34. Kleinmann, H. & Stern, K. G. (1930). *Biochem. Z.* 222, 31, 84.
35. Northrop, J. H. (1930). *J. Gen. Physiol.* 13, 465.
36. ——— (1932). *ibid.* 16, 33.
37. 田沢 (1944). *Acta phytochimica* 14, 75.
38. Norris, E. R. & Mathiews, J. C. (1953). *J. Biol. Chem.* 204, 673.
39. Van Herwerden (1903). *Z. physiol. Chem.* 56, 463.
40. 高田 (1925). 日本医学輯 (II) 1, 11.
41. 注解日本薬局方 (第六改正) (1951). 246p. 南山堂.
42. 小野・広海 (1954). *Proc. Jap. Acad.* 30, 467.
43. Rona, P., Kleinmman, H. & Dressler. (1930). *Biochem. Z.* 228, 6.

結晶鯨インシュリンに関する研究

第1報 分離及び結晶化

斎藤恒行・石原義雄・伊藤裕三・藤野政彦
(北海道大学水産学部水産化学教室)

Studies on Crystalline Whale Insulin

I. Isolation and crystallization

Tsuneyuki SAITÔ, Yoshio ISHIHARA, Yasuzô ITÔ
and Masahiko FUJINO

Abstract

Various purification procedures were examined for chemical and clinical studies of whale insulin. It was ascertained that the method of extraction with dilute acetone and then precipitation by zinc sulfate was most suitable for the preparation of the crude whale insulin. For the crystallization of insulin, Scott's method was improved to give a good yield from the crude insulin preparation. The procedure used by the present writers differs from Scott's one in respect to requiring the addition of a small amount of acetone.

The crystals of whale insulin prepared by this method have the same microscopic appearance and the same physiological properties as those of cattle insulin.

陸上動物のインシュリンに就ては，古くより多くの研究がなされている。就中牛のインシュリンに就ては1926年 Abel が結晶として取り出す事に成功して以来，結晶化の方法も種々改良され1935年 Scott[1]の考案による方法が今日広く用いられるに至り工業的な実施も行われている。又硬骨魚類[2][3][4] のインシュリンに就ても結晶化が成功している。

著者等[5][6] は Scott の方法により鯨インシュリンの結晶化を行い，更にこれ等，牛，魚，鯨三種のインシュリンの生理学的活性を比較して最高作用発現時間に多少のずれを生ずるが，其の効力は殆んど差のないことを明らかにしている。

du Vigneaud 等[7]は牛，豚の脳下垂体後葉ホルモン Vasopressin に就て，その構成アミノ酸を調べ，豚 Vasopressin には Arginine が存在せずに Lysine が入れ替つている事を示し，動物の種特異性がホルモンのアミノ酸組成に見られる事を明らかにしているが，インシュリンに於ける種特異性の有無も興味をひく所である。

結晶インシュンの蛋白質化学的な研究も1946年来 Sanger 一派の研究によつて，牛，豚，羊等の結晶インシュリンの構成アミノ酸，N末端，C末端等が明かにされ，1951年に Sanger[8]により牛インシュリン，更に1955年に Brown[9] 等によつて，豚，羊のインシュリンの構造が決定されるに至つた。これ等の結果によると，牛，豚，羊相互間にその構成アミノ酸に若干の差を示し種特異性が認められた。即ち1949年にSanger[10]の定性的な結果，1952年に Harfenist 及び Craig等[11]の定量的な結果によると第一表に示した如く，Serine, Glycine, Threonine, Alanine, Valine, Isoleucine の含量に差のある事が明らかにされた。

N末端は三者共 Phenylalanine, Glycine であり，C末端は Sanger の行なつた Carboxypeptidase 法によると Alanine, Asparagine が検出され，Hydrazine 法によると Alanine, Glycine であるとされている。この

Table 1. Amino acid composition of insulin from different sources. (Harfenist *et al.* 1952)[11] (number of residues/mole of insulin)

Amino acid	Beef I.	Pork I.	Sheep I.
	mol. wt. 5734	mol. wt. 5778	mol. wt. 5704
Serine	2.89	2.79	2.07
Threonine	0.97	1.77	0.96
Glycine	3.94	3.94	4.76
Alanine	2.91	2.17	2.99
Valine	4.68	3.68	4.80
Isoleucine	0.66	1.54	0.69

結果三者の構造は Phenylalanine 鎖に於ては全く同一であるが，Glycyl 鎖では，その一部に相違が認められたのである。魚インシュリンに就てはC末端に Lysine が特異的に検出されている[12]。鯨インシュリンに関しては著者等[9]の定性的な研究によると構成アミノ酸は牛等のインシュリンと殆んど同じであるが，鯨には α-Aminobutyric acid が特異的に検出され，又N末端は牛等と全く同様 Phenylalanine, Glycine を，C末端では Glycine, Alanine の他に α-Aminobutyric acid を特異的に検出した。

著者等は以上の結果に基づき鯨インシュリンの構成アミノ酸の完全分析，末端基，其の他理化学的研究を定量的に行う考えのもとに，其の第一段階として大量の結晶を得る為，従来の Scott の結晶化の方法を検討しこれに改良を加え良好な結果を得る事が出来たので，こゝに報告する。

実 験 の 部

I 試料，1955年5月29日金華山沖にて捕獲されたイワシ鯨（*Balaenoptera borealis* Lesson）体長43呎，♀の膵臓を凍結貯蔵したものを用いた。

II 力価の測定，Marks 法及び TorontoII 法に準じ，血糖定量は常法通り Hagedorn-Jensen 法に従つた。

III 実験経過並に考察

1 粗インシュリン製造

A Alcohol 抽出法

i) Scott 法

膵臓磨砕物1kgを2*l* の塩酸酸性アルコール（pH2.2, C_2H_5OH : CH_3OH, 9 : 1 vol）にて，常温5時間抽出し，濾過後其の濾液に10%アンモニヤ水を加え pH 8 とし，不純蛋白質を沈澱除去する。得られた濾液に3N硫酸を加え pH 3 以下とし，濾液の⅓量になる迄35°C 以下で減圧濃縮後直ちに温度を50°C に上げ約5分間保つた後急冷し脂肪を遊離せしめて除去。かくして得られた濾液に食塩を25%加えて塩析を行い，一夜放置後，沈澱を取りN/100塩酸に溶かし再び食塩にて15%塩析を行つた。こゝに得られた塩析物をアセトンで脱水洗滌後，硫酸デシケーター中で減圧下乾燥した。

ii) 硫酸亜鉛，酢酸亜鉛添加法

上記方法の中濃縮を⅓量に止め，脂肪除去後の濾液に飽和硫酸亜鉛溶液，飽和酢酸亜鉛溶液を夫々濾液1*l* 当り50ml の割で加え，直ちにN/2苛性ソーダにて pH5.6とし，一夜放置後得られた沈澱を集めN/100塩酸に溶かし25%塩析，15%塩析を行い，上述の操作と同様にして乾燥した。

B Acetone 抽出法

膵臓磨砕物1kgを1.5*l* の塩酸酸性アセトンにて室温5時間抽出を行い，pH 8 沈澱を行なつた後，約⅓量迄減圧濃縮を行い，脂肪を除去し得られた濾液に飽和亜鉛液，飽和酢酸亜鉛溶液を濾液1*l* に対し50mlずつ加えpH5.6とし，一夜放置後得られた沈澱をN/100塩酸に溶かし，食塩にて25%，15%塩析を行なつた後，アルコール法と同様の操作によつて乾燥した。

上述の種々の方法で得られた粗インシュリンの収量は第二表に示す如くである。

Table 2. Insulin yields by various methods

Methods		Crude Insulin		
		g per kg of pancreas	I. U. per mg of preparation	I. U. per kg of preparation
Extraction with alcohol	Scott's method	0.586	2.5	1465
	Ppt. by zinc sulfate	0.152	3	456
	Ppt. by zinc acetate	0.146	2	292
Extraction with acetone	Ppt. by zinc sulfate	0.730	2	1460
	Ppt. by zinc acetate	0.234	2	468

この結果 Scott 法並にアセトン抽出硫酸亜鉛法が良い結果を示す事がわかつた。しかしながら Scott 法は後段の精製段階に於て共存不純物の除去が困難で多量の損失を見た。この点アセトン法に於ては柴田[13]の詳細な研究にも明らかな様に鯨インシュリン製造には最も適当な方法と考えられる。柴田の結果では，この方法で大体膵臓kg当り700単位であつて著者等の場合に於ても本標品の等電点沈澱2回繰返すことによりmg当り約10単位のものとする事が出来大体近似した値が得られた。

2　結晶化

インシュリンの結晶化には Abel法[14]，Scott法[1]，Haringtonn法[15]，Stallman法[16]等があるが，最も広く用いられているのは Scott 法であつて，鯨インシュリンについては，著者等[5,6]も Scott 法で結晶化を行なつている。しかしながら，この方法を鯨インシュリンに其のまゝ適用するときは，pH5.9に近づけると相当量が Amorphous に移行し結晶化が仲々困難であつた。其の上収量の面でも常に一定の値を示さず，良い時で60%，悪い時には10%前後であつた。そこで著者等は Stallman の鉄イオンと亜鉛イオンを共に加えて晶出せしめる方法を行なつて見たが収量は一定となつたが非常に悪かつた。次に Scott 法でアセトンを含む母液より結晶の晶出する事が認められたので，アセトン溶液より溶解度の差により晶出する可能性があるものと考え第一図に示す様に処理した所極めて良好な結果が得られたのである。その結果は第三表に示す。

Table 3. Yields of crystal insulin from crude insulin

Methods	Crude Insulin	Yield of Crystals	Recovery
Authors' method	1. 1.000 I.U.	910 I.U.	91%
	2. 1.000	866	86
	3. 1.000	800	80
mean		858	85
Scott's method	1.000	550	55
Stallman's method	1.000	300	30

第三表に示す如く著者等の方法は平均約85%の収量を得る事が出来，Scott 法，その他の方法に比し鯨インシュリンの結晶化には適当であると考えられる。

第二図に示す鯨インシュリン activity 測定結果から考察すると，鯨結晶インシュリンの効力は，牛の標準インシュリンに比しなんら劣つていない事が認められる。尚対照の意味で牛及び魚の結晶インシュリンの大体同単位の血糖降下曲線を測定したが，その結果鯨インシュリンは魚インシュリンよりは牛インシュリン

Crude insulin (100mg. 10 I.U./mg.)

Dissolved in 10 ml. of dil. HCl (pH 2.0) and filtered.

Filtrate

Added slowly NaOH solution (0.1N) to adjust the acidity to the isoelectric point of insulin. pH 5.2–5.4

After standing over night in ice-chest the precipitate was removed by centrifugation.

The isoelectric precipitate

Dissolved in 7.2 ml. of dil. acetic acid solution.

After the addition of acetone to a concentration of 30 per cent, the acidity was adjusted to pH 5.9 by the addition of dil. NH_4OH.

After standing for about 2 hours at room temp., a flocculant ppt. was removed by centrifugation.

Acetone filtrate

Diluted to an adequate volume (ca. 24 ml.) by the addition of an ammonium acetate buffer, pH 5.9

Added a solution of zinc acetate (ca. 0.03 ml.), pH 5.9 with stirring

Stored at room temp. for 10 hours and at refrigerator temp. for another 12 hours.

Ppt. containing the active principle was separated from the mother liquor by centrifugation.

Mother liquor

Stored in refrigerator

Crystals

Ppt.

Dissolved in 4 ml. of dil. acetic acid solution.

Added a solution of zinc acetate (ca. 0.03 ml.)

Adjusted the acidity to pH 7.0 with dil. NH_4OH

The acidity was then carefully adjusted to pH 5.9 by dropwise addition of n/3 acetic acid as might be required.

Stored at room temp. for 10 hours and at refrigerator temp. for another 12 hours.

Zinc-insulin crystals formed were separated by centrifugation.

Crystals

Directly after dissolving in 4 ml. of dil. acetic acid, centrifugation, and adding a solution of zinc acetate, adjusted the acidity to pH 5.9

Ppt. formed was removed by centrifugation.

Spuernatant

Added an adequate volume of acetone

Stored at room temp. for 10 hours and at refrigerator temp. for another 12 hours.

Crystals

Ppt.

Dissolved in dil. acetic acid solution

Added a solution of zinc acetate.

Adjusted the acidity to pH 7.0 with dil. NH_4OH and then to pH 5.9 by addittion of N/3 acetic acid.

Ppt. formed was removed by centrifugation.

Supernatant

Added an adequate volume of acetone

Stored in refrigerator.

Crystals

Total crystals: 38.6 mg. (22 I. U./mg.)

: Process as modified by the authors

Fig. 1. Scheme for crystallization of whale insulin

に似た作用を示す事が認められた。

次に得られた鯨インシュリンの結晶の形状を第一図に示す。牛の場合では Abel の方法では斜方六面体，Harington の方法では立法体又はこれに近い斜方六面体である。鯨の場合でも大体六面体である事は同様であるが，その形は各種条件，即ち水素イオン濃度，亜鉛含量等のわずかの差によつて変化が見られる。しかし図に示す如く楔形，斜方六面体等が主である。この他或る条件下六角錐双晶の 'cut-form' が得られる。

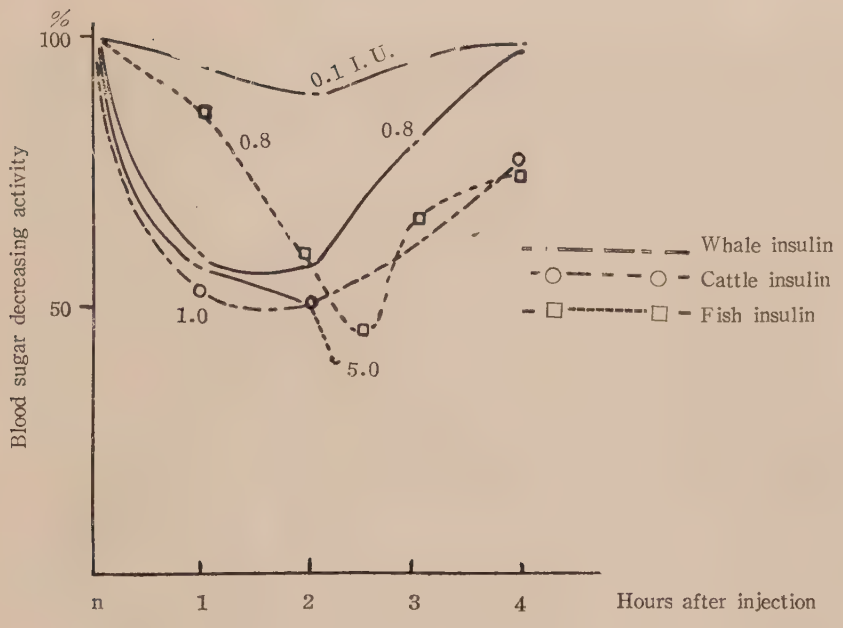


Fig. 2. Blood sugar curves following the injection of various insulin

尚本研究の遂行に当り試料の採取に多くの御便宜を計られた，日本水産女川捕鯨場研究室，後藤賢二氏に深謝する。

文　献

1) Scott, D. A. (1934). *Biochem. J.* 28, 1592.
Scott, D. A. & Fisher, A. M. (1935). *ibid.* 29, 105.
Romans, R. G., Fisher, A. M. & Scott, D. A. (1940). *Ind. Eng. Chem.* 32, 908.
2) Jensen, H., Winterstein, O. & Geiling, E. M. K. (1929). *J. Pherm. exp. Therap.* 36, 116.
3) Scott, D. A. (1931). *J. Biol. Chem.* 92, 281.
4) 佐藤・谷野. (1948). 化領 2, 132.
5) 斎藤・石原・横山. (1954). 日本水産学会北海道支部例会（於余市　10月19日）講演.
6) 斎藤・石原・横山. (1955). 日本水産学会年会講演会（於東京　4月4日）講演.
7) du Vigneaud, V. (1953). *J. Biol. Chem.* 205, 249.
8) Sanger, F. (1951 a). *Biochem. J.* 49, 463.
— (1951 b). *ibid.* 49, 481.
9) Brown, H. Sanger, F. & Kitai, R. (1955). *Biochem. J.* 60, 556.
10) Sanger, F. (1949). *Nature* 24, 529.
11) Harfenist, E. T. & Craig, L. C. (1952). *J. Am. Chem. Soc.* 74, 4216
———— (1953). *ibid.* 75, 5528.
12) 赤堀. (1954). 蛋白質化学 II, 177p.
13) 柴田. (1952). 福岡医誌 43, 41.
14) Abel, J. J. (1925). *Science* 47, 169.
———— (1927). *J. Phermacol.* 31, 65.
15) Harington, C. R. & Scott, D. A. (1929). *Biochem J.* 23, 393.
16) Stallman, B. (1937). *Arch. exp. Path. und Pharm.* 185, 77.

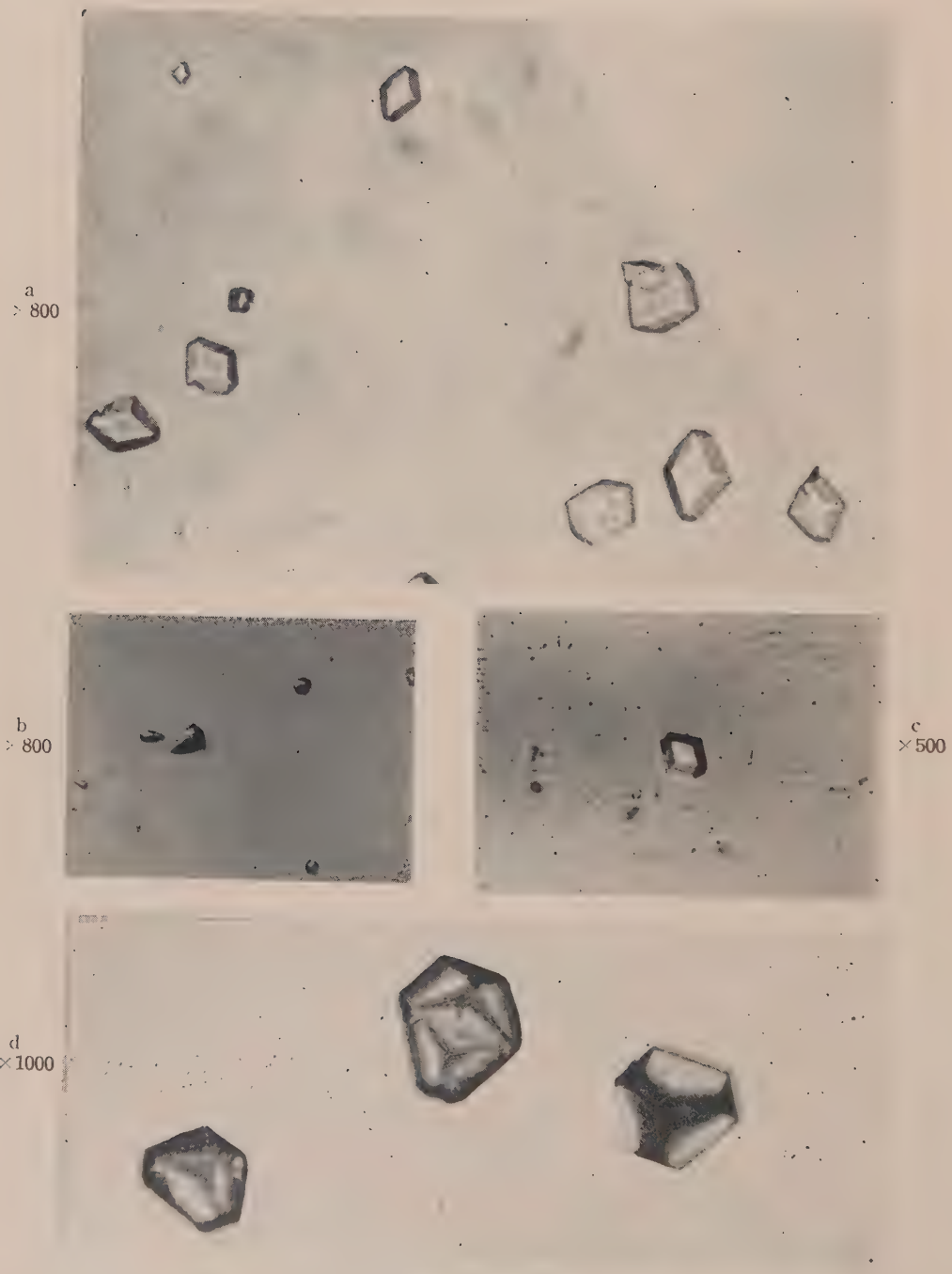


Fig. 3. Crystals of whale insulin

イカ完全利用に関する研究

第13報　スルメ製造に関する研究（其の五）
原料イカの鮮度とスルメ製品々質との関係

谷川英一・元広輝重・富田幸二
（北海道大学水産学部水産食品製造学教室）

Studies on the Complete Utilization of Squid (*Ommastrephes sloani pacificus*)

XIII. Relation between the freshness of raw squid and the quality of the merchandise of the dried squid

Eiichi TANIKAWA, Terushige MOTOHIRO and Kôji TOMITA

Abstract

The authors have investigated the relation between the freshness of raw squid meat and the quality of the dried squid as prepared for the market ("surume").

Raw squid meat was stored at room temperature (15°～17°C) in order to bring about different degrees of freshness. The several raw squids having such various degrees of freshness were dried under the sun light to make dried squid. These samples were compared by means of chemical and organoleptic tests with commercial dried squid (Grades I～V) which had been graded by the Government Inspection Station. According to the results obtained, raw fresh squid meat having less than 20 *mg%* of volatile basic nitrogen as an index of freshness should be dried in order to make good quality of dried squid of Grades I～II for the market.

イカを天日乾燥してスルメを製造する場合，その製品品質を左右する主要な条件として原料イカの鮮度があげられる。故に若し製品品質と原料の鮮度との相対的関係が明らかとなれば製品品質を検査することによつて原料の鮮度を推定することが出来，又反対に原料イカの鮮度を知ることによつて，これを正常条件で乾燥した場合の品質即ちスルメの検査等級を知ることが出来ると考えられる。こゝで著者等は原料の鮮度とスルメ製品品質との関係を検討した。

原料イカの鮮度を鑑定する方法としては揮発性塩基窒素（V. B.-N）量を定量する方法を採用した。なお同時にpH値を測定し，官能的検査をも併せ行つた。スルメ製品品質の検査についてもV.B.-N量，pH値，官能的検査を行つたが，特に表皮の下層にある色素細胞の状態について観察した。又別に農林省輸出物検査所において格付したスルメの第一等品より第五等品までの製品を入手し，これについても同様の実験を行い実験室で鮮度を異にした生イカ原料より製造したスルメと比較検討した。

I　原料イカの鮮度と製品品質との関係

1　実験方法

11月上旬より中旬にかけて秋イカの鮮度良好なスルメイカ（*Ommastrephes sloani pacificus*）を実験室に持ち帰り，鮮度を変えるため室温（15°～20°C）にそのまま放置し，一定時間毎に取出して胴肉の一部を

採取して細砕試料を調製し，V. B.-N 量と pH 値を測定し，その際のイカ肉の状態を官能的に観察した。胴肉の一部を切りとつたイカは内臓を除去し，普通スルメを製造する時と同じような形に調理し，直ちに天日乾燥してスルメ製品とした。スルメ製品の乾し上りは水分量20～25%程度とした。

2 実験結果

鮮度を変えたイカ原料肉について V.B.-N量，pH値，外観等について実験し，原料の鮮度は V.B.-N量にして50*mg*%までのものまで低下させ，これ等を試料番号1～11とした。

又鮮度を種々に変えた試料1～11を乾燥して得たスルメ製品の状態を実験したが原料イカとスルメ製品中のV. B.-N量及び pH値の関係を図示すれば夫々第1図及び第2図の如くである。

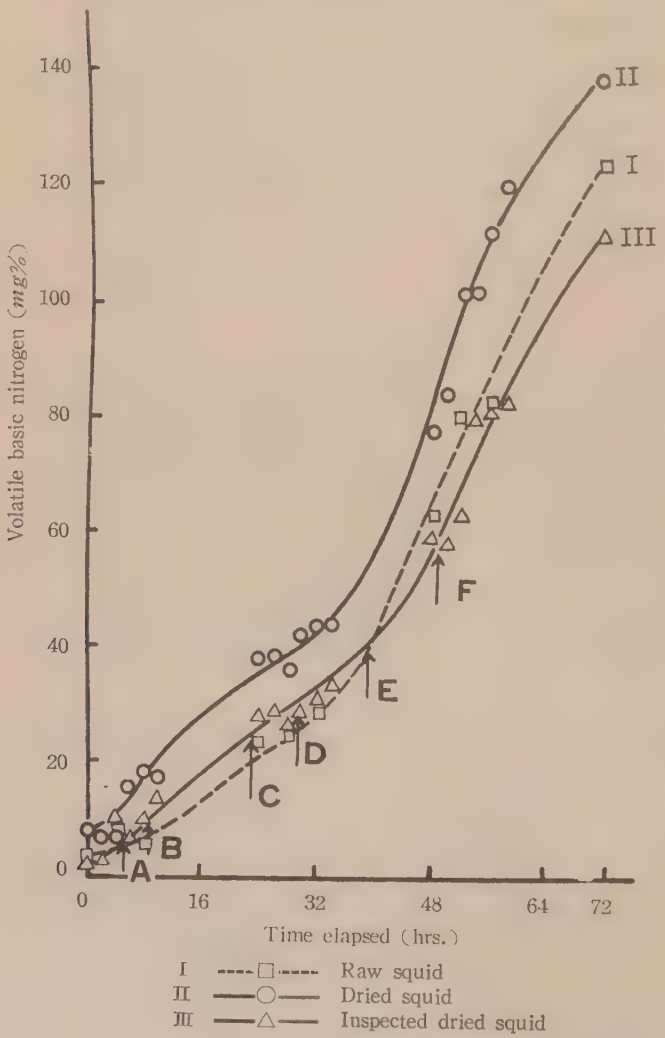


Fig. 1. The amount of volatile basic nitrogen (V.B.-N) in raw or dried squid

Note: A～F, Tachiki's grade of dried squid by the appearance of the pigment cells.

V. B.-N量を示す第1図において，生イカについての I-曲線とスルメ製品についての II-曲線とは略々平行的な関係を示す。即ち鮮度を低下させた原料イカを乾燥してスルメとした場合，スルメ製品中のV. B.-N量はやはり多い。これはイカ肉が正常条件（晴天，低湿度）で急速に乾燥される時は肉の分解が起るよりもむしろ水分量の減少に伴い，より大きくV. B.-N 量は相対的に増加するものと考えられる，併しこれ等二つの曲線をよく見るにII-曲線はI-曲線ほど円滑な曲線でなく，凹凸がかなりある。これは更に同一試料番号における原料イカ肉中のV. B.-N量に対するスルメ製品中のV.B.-N量の関係を図示した第3図をみればよくわかる。即ちI- 曲線に比しII-曲線に凹凸のあることからわかる。これはイカ肉乾燥中天然乾燥のため条件が一定にし難く実際はイカ肉の分解を起したものもあることを示すものである。第2図に示す pH 値の関係においても相対的に pH 値の増加をみているが，これはむしろ乾燥中の肉はいく分か分解の起ることを示唆するものであろう。以上のように鮮度を変えた生イカとそれらを乾燥したスルメ製品の V. B.-N 量と pH 値との間には一応相関々係が

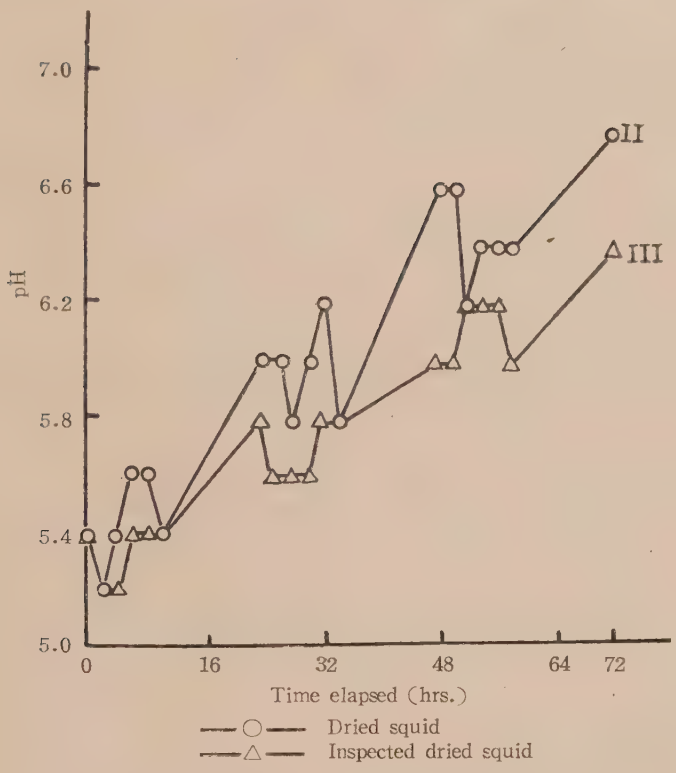


Fig. 2. pH values of dried or inspected dried squids

認められるが，こゝに注目すべき事実は表皮下層の色素細胞の状態である。色素細胞の状態は本実験のように低湿度の条件で急速に乾燥した場合は生の時もスルメとした場合も略々同一状態を示している。スルメの鮮度を鑑定する方法として立木[1]の提唱する色素細胞の状態を観察する方法はこの生とスルメとした時の鮮度の関係を明らかにするものである。立木のスルメの鮮度と色素細胞の形態との関係を図示すれば第4図(後掲)の如くである。第4図において(A)は鮮度の極めてよい状態のもので，俗に「朝焼イカ」と云われるもので，色素細胞は亀甲状になつてその角は鋭角であつて，黄橙色である。(B)は(A)よりやゝ鮮度劣るものであるが，鮮度未だ良好である。色素細胞の角が多くなり，やゝ円味を帯びてくる。(C)は(B)より更にその鮮度が落ちたもので，多くなつた角は更に円味を増し，角と角との距離が小さくなり，切込みがやや深くなる。(D)は鮮度は初期腐敗程度となり，角は全くなくなり，鰭局は深くなり角が叉状にさらに大きくなつてゆく。(E)は更に鮮度悪くなり色素細胞の中央部がとけて空となつた状態，(F)は鮮度が極端に悪くなり腐敗臭を発するもので細胞は流れて線状になつているものである。これ等色素細胞の状態を第1図のV. B.-N量と比較すると(A)はV. B.-N量10*mg*%以下，(B)は約10*mg*%，(C)は約20*mg*%，(D)は約30*mg*%，(E)は約40*mg*%，(F)は50*mg*%以上となり，鮮度と色素細胞の状態との関係は明らかとなつている。これをスルメの鮮度と色素細胞の状態との関係をみても同様のことがわかり，こゝにスルメの色素細胞の状態からその原料の生イカの鮮度も推知することが出来る。但しスルメの色素細胞の状態が悪いと云つて始めの生イカの原料の鮮度が落ちていたとのみ云えず，乾燥途中において雨天，曇天のため乾燥進まず，肉の分解により鮮度が落ちることもある，何れにしても色素細胞の状態はスルメ自身の鮮度を示すものと云える。この点，立木[1]のスルメの鮮度鑑定法は優秀なものと云えよう。

II　標準検査規定により格付けされたスルメ製品の状態

前項の実験結果を市販スルメ製品と比較対照するため，農林省輸出物検査所より分譲された格付スルメ（第一等品より第五等品までのもの）についてV.B.-N量，pH値並びに官能的検査を行つたが，それ等の結果は第1表及び第2表並びに第1図及び第2図中に III-曲線として表わしたものである。それらの結果をみるに格付け等級の低下につれてV. B.-N量及びpH値は増大する。併し第一等製品と第二等製品との間では化学的にも官能的にも特別の著しい差異はない。今便宜上第一等品乃至第五等品の間におけるV. B.-N量及びpH値の関係から各等級の限界をV. B.-N量及びpHで表わすと第3図及び第5図上横軸のⅠ→Ⅴの如くなる

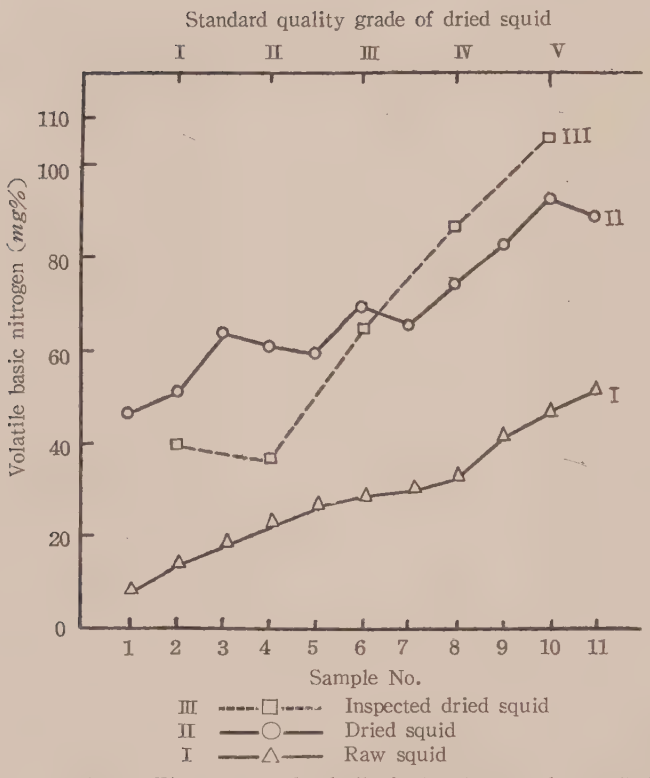


Fig. 3. The amount of volatile basic nitrogen (V.B.-N) in raw or quality graded dried squid

Table 1. The amount of V.B.-N, pH value of the inspected dried squid

Inspected grades	Inspected dried squid	
	V.B.-N (mg%)	pH
I-grade	39.5	5.6
II-grade	36.4	5.8
III-grade	64.0	5.8
IV-grade	84.5	6.0
V-grade	104.3	6.4

Table 2. Organoleptic tests for inspected dried squid

Inspecting grades	Condition after drying	Meat	Form	Appearance of pigment cells	Tachiki's grade
I-grade	Good (Minimal of water-content)	Thick, glossy, Color good	Good form. The length was about 23 cm.	The angle of tortoise shell shape of the pigment cells was sharp.	(A)
II-grade	ditto	ditto	Almost good form. The length was about 22 cm.	The angle of the cell became dull.	(B)
III-grade	Ordinal of water-content. (Not moist)	Average, Color somewhat red	Shape and size were not average. The length was about 21 cm.	The curvature of the cell became great.	(C) (D)
IV-grade	Worst like V-grade. Moist.	Thin, not glossy, fragile	Shape was not average. The length was about 20 cm.	The centre of the cell dissolved and gap generated.	(E)
V-grade	Worst Moist	Thin, not glossy, Very fragile	Shape was not average. The length was about 18 cm.	The cell dissolved and became thin like a line.	(F)

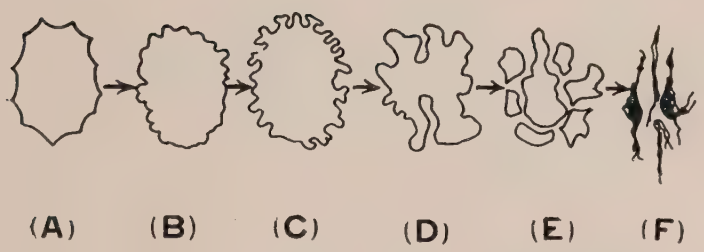


Fig. 4. Tachiki's grade of dried squid by the appearance of the pigment cells

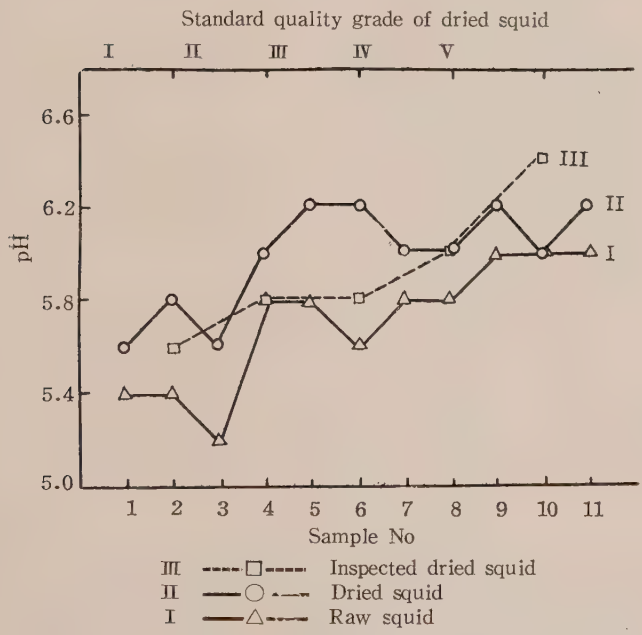


Fig. 5. Comparison of pH values with raw and dried squids

これらの等級を第2表及び後載の第3表の色素細胞の状態と比較すると等級と第4図の(A)→(F)との間に相関々係があることがわかる。第3図より第一等品及び第二等品のスルメを製造するためには原料イカの鮮度はV. B.-N量にして少くとも10～15*mg%* 以下のものを急速に天日乾燥しなければならないこととなる。

III 考　察

前述の実験結果より原料イカの鮮度とスルメ製品並びに格付けされたスルメ製品との相互関係を一括表示したのが第3表である。又第6図は原料イカとスルメ製品のV. B.-N量の関係を示した。

第3表よりみるに雨天に遭遇することなく正常乾燥条件下において各等級製品の得られる諸条件を検討すると次の如くになる。

第一等検製品：この等級に相当する製品をつくるためには原料イカの鮮度はV. B.-N量にして10*mg%*以下，pH 5.4以下の如き極めて新鮮なものでなければならない。色素細胞は正常で亀甲状の角のあるものでなければならない（立木標準[1](A)）。

第二等検製品：この等級の製品のpH値は5.8を示し，これは実験的に製造したスルメNo.1よりやゝ高く，No. 2と同じ値である。又製品のV.B.-N量は 36.4*mg%* で，製品としては比較的低い値を示す。pHの値よりみればNo. 2試料に属し，その原料鮮度はV. B.-N量にして 14.2*mg%*，pH 5.4，放置時間は5～6時間で原料の肉眼検査ではNo. 1試料と見分けのつかぬ程度の新鮮な原料を用いた場合で，色素細胞の亀甲状の角がややとれかけたもの（立木標準[1](B)）。

第三等検製品：この等級に属する製品のV. B.-N量は 64.0*mg%*を示し，実験試料 No.3～No. 7に相当する。これは原料のV. B.-N 量にして 18.5～29.9*mg%* の広い範囲を示し，原料がやや落ちたものから初期腐敗までの原料を使用して製造した場合にはこの等級の製品となる。この場合の色素細胞の周縁の彎曲は深くなつている（立木標準[1](C)～(D)）。

第四等検製品：この等級の製品のV. B.-N量は 84.5*mg%*であり，実験試料No. 9に相当し，pH値からみれば6.0であつて実験試料 Nos. 4～10 の間の範囲のものである。従つて原料の鮮度はV. B. -N 量において

Table 3. Relation between the quality grade of dried squid and the freshness of raw squid

Inspected grade	Correspondence for raw sample No.	V.B.-N (*mg%*) of raw squid corresponded to dried squid	Organoleptic test of raw squid corresponded to dried squid	Tachiki's grade	pH of raw squid corresponded to dried squid	Storing time (hrs.) of raw squid
I	No.1	below 8.5	Very fresh, meat tough. Pigment cell had tortoise shell shape.	(A)	below 5.4	0
II	No.2	ditto	Fresh, tough meat. The angle of the cell became dull.	(B)	ditto	ditto
III	Nos.3~7	18.5~30	Unfresh, meat tender, (incipient putrefaction). Ammonia smell. Curvature of the surroundings of the cells became great.	(C) (D)	5.2~5.8	24~31
IV	No.9	42	Putrefactive smell. The shape of viscera crumbled. The center of the pigment cells dissolved and made gap.	(E)	6.0	50~52
V	No.11	above 50	Meat tender. The pigment cells became thin like a line.	(F)	above 6.0	52~56

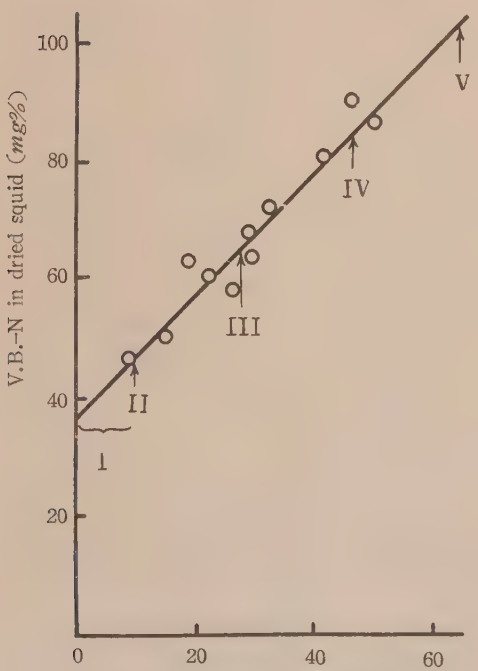


Fig. 6. The amount of volatile basic nitrogen in squid against to that in dried squid

Note: I~V, showing standard quality grade of dried squid.

41.7*mg%* であつて，初期腐敗以下の鮮度低下のものを用いた時はこの製品が出来る。この場合の原料を肉眼的にみてもすでにやや腐敗臭があり，肉質は軟化し，内臓も崩れ，色素細胞の中央部が溶け，空隙を生ずる（立木標準[1]（E）程度のものである。

第五等検製品： この等級の製品は既に 104.3*mg%* の如き高いV. B.-N量を示しており，実験試料のNo.11に相当し，その原料の鮮度は 50.0*mg%* 以上を示し，殆んど腐敗に達しているような原料を使用すればこの製品となる。この場合の色素細胞は全く溶け線状となる（立木標準[1]（F））.

併し実際スルメ製造においては第四等検，第五等検製品の原料と云えども殆んど腐敗したような原料を使用するということは稀であつて，前述の如く乾燥途中の曇天又は雨天による第二次的鮮度低下により，ムレ又は雨イカとなつたため，この種等級の製品が出来るのである。ムレイカ，雨イカの問題は後報で解明しよう。

以上の如く第一等検より第二等検製品を得んとすればイカ陸揚後最大放置時間6時間以内のV.B.-N量にして15*mg%* 以下の新鮮なイカ原料を乾し上げねばならないし，第三等検製品にしてもその範囲は広いが，その中でも上位の製品を得んとすればV.B.-N量にして20*mg%* 以下の鮮度の原料を使用しなけれ

ばならない。V.B.-N 量の 30*mg%* の初期腐敗（官能的にややアンモニア臭のあるもの）及びそれ以下の鮮度の原料を用いて乾し上げても到底第二等検乃至は第一等検の製品を作ることは不可能に近く，多くは第四等検乃至は第五等検製品となり，手数を加え，外観をよく仕上げたとしても第三等検止りであろう。

今便宜のために検査等級に対する原料鮮度条件と原料の最大放置時間（処理までの）との関係を表示すると第4表の如くになる。即ちこの表によつて原料の鮮度がわかれば製品とした後の等級を推定できる。

Table 4. Relation between the grade of dried squid and maximum limit time of storing raw squid

Inspected grade	V.B.-N (*mg%*) in raw squid	pH of raw squid	Appearance of pigment cells of raw squid	Tachiki's grade	Maximum limit of storing time (hrs.) (landing in morning)
I	below 5～10	below 5.4	The angle of tortoise shell shape of pigment cells was sharp.	(A)	Prepared immediately after landing.
II	below 20	ditto	The angle of the cell became dull.	(B)	Prepared immediately after landing or at least before noon.
III	20～30	below 5.8	The curvature of the surroundings of the cells became great.	(C) (D)	Prepared in morning following landing.
IV	40～50	6.0	The center of the pigment cells dissolved and made gap.	(E)	Prepared in the afternoon after two days.
V	above 50	above 6.0	The pigment cells became thin like a line.	(F)	Prepared later than second day's afternoon.

要　　約

スルメイカ原料の鮮度を種々変えてこれを天日乾燥して製造したスルメの製品品質を市販の格付けされたスルメ（第一等検乃至第五等検）の製品々質と化学的並びに官能的に比較検討した。その結果第一等検及び第二等検の製品並びに第三等検の上位の製品を製造するには V. B.-N 量にして20*mg%*以下の鮮度のよいものを原料とすべきであることがわかつた。初期腐敗（V. B.-N 量にして 30*mg%*）以上に鮮度の落ちた原料を用いれば第四等検以下の製品となる。イカの鮮度の低下状況から原料の放置時間を便宜的に表示した。

文　　献

1) 立木金吾：水検月報（31）4.（1951）

イカ完全利用に関する研究

第14報　スルメ製造に関する研究（其の六）
スルメ製造時におけるイカ肉の乾燥度と腐敗性との関係

谷川英一・長沢善雄・竹内敏夫・杉山　隆
（北海道大学水産学部水産食品製造学教室）

Studies on the Complete Utilization of Squid
(*Ommastrephes sloani pacificus*)

XIV. Relation between the water content of squid meat and putrefaction during the drying of squid

Eiichi TANIKAWA, Yoshio NAGASAWA, Toshio TAKEUCHI and Takashi SUGIYAMA

Abstract

The condition in respect to putrefaction varies according to the water content of squid meat in the initial drying period when raw squid is drying. For example, when the weather is cloudy or rainy and the relative humidity is high, squid meat having larger amount of water content becomes rapidly putrefactive during the initial period of drying. Then what is the amount of water content in squid which will retard the putrefaction in the initial drying period?

The authors have dried squid meat having various amounts of water content in the atmosphere of various relative humidities at different temperatures in order to ascertain the time when putrefaction begins. According to the results obtained, when the water content of squid meat becomes less than 50～55%, the putrefaction becomes slow. When the degree of dryness indicating a change in water content of the squid meat during the drying, $\gamma=\frac{W}{W_0}=\frac{m+d}{m_0+d}$ (Here, W_0 is the initial weight of the squid meat, W is the weight of the squid meat at a definite time during drying, m_0 is the initial amount of the water content of squid meat, m is the amount of the water content at a definite time during drying, d is the weight of the anhydrous matter of squid meat), is less than 0.7, the time to reach putrefaction becomes 1/10 of the putrefactive velocity of the raw squid meat.

Therefore the drying degree (γ) should be less than 0.7 at the initial drying period even if the weather is worse.

In order to make the drying degree (γ) less than 0.7, there must be dehydration by some means. The authors have used a strong air blast to dehydrate at the initial drying period. When the relative humidity is below 80% and the wind velocity is more than 11m/sec, the dehydration occurs under those conditions.

スルメ製造中，曇天又は雨天がつづき高温多湿の環境におかれたイカが若し未だ乾燥が充分でなく，含水量が多い時はムレイカ又は雨イカとなる。谷川[1]等は先にムレの現象につき研究し，関係湿度85%以上の環境の時に未乾のイカはムレを生じ，肉の揮発性塩基窒素（V. B.-N）量は30～35mg%，pH 6.5以上となることを報告した。然しながらイカが或程度その乾燥が進み，含水量が少くなつている場合はイカ肉はムレ難い。このイカ肉の乾燥度（イカの初めの重量と乾燥中の重量との比，換言すれば乾燥中のイカの含水量）とムレになる条件との関係を知ることはスルメ製造上重要なことである。こゝに著者等はそれらの関係について諸

種実験を行つたのでそれらの結果を報告する。

I　イカ乾燥初期における乾燥速度

急速に一定の含水量迄乾燥したイカを高温多湿の環境においた場合，そのムレ発生までの時間はその肉中の含水量の少い程長時間を要する。なお生イカを乾燥し，一定含水量のスルメを得るまでの初期の乾燥条件はその後のムレ発生に対して大なる影響を及ぼすものである。例えば生イカを乾燥するに当つてその初期における乾燥環境が高温多湿であるならば，乾燥後の含水量がたとえ少量であつてもその含水量に乾燥されるまでに一定時間以上要しており既にその乾燥途中において肉質が分解し，ムレたスルメとなる。故にこゝでは一先ずイカを高温多湿でない環境，即ち温度20°C;関係湿度80%で乾燥した時の，各乾燥度に至る迄の時間を測定した。

1）　実験方法と試料

函館近海産の秋イカを試料とし，内臓を除去後，スルメを製造する時と同じように調理し，これを第1図の如き恒温恒湿器の内で，温度20°C,関係湿度80%，風速11*m/sec.* の条件で急速に乾燥し，乾燥前のイカの重量（W_0），乾燥中一定時間毎のイカの重量（W_n）を測定し，乾燥度（γ）=（$\frac{W_n}{W_0}$）を測定時間の函数として求めた。

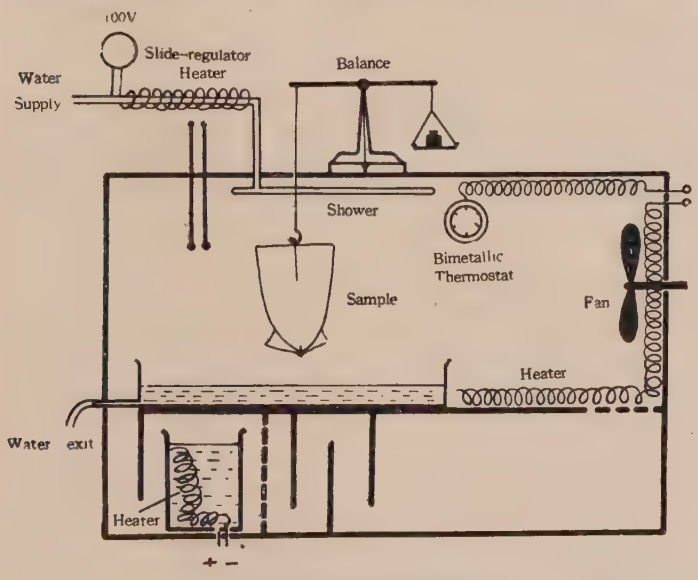


Fig. 1.　Estimating apparatus

2）　実験結果

上記の実験によつて得られた結果は第1表の如くである。第1表中の乾燥度（γ）と乾燥時間（t_d）との関係を半対数グラフに示したものが第2図（次頁）である。第2図により明らかな如く乾燥時間（t_d）と乾燥度（γ）との関係は乾燥の初期（12時間以内）においては直線関係にあり，与えられた条件下では，$\gamma \fallingdotseq 0.5$になるには12時間を要する。

II　含水量（乾燥度）の異るイカを高濕度の環境においた場合の変化

含水量の多いイカを高温多湿の環境におくとムレるが，たとえ高温多湿の環境でもその含水量が少い時はムレ難い。こゝで高温多湿の環境でもムレを起さない含水量を知るため，先ず含水量の異るイカを温度20°C,関係湿度90～95%の環境においた場合の変化をみた。

1）　実験方法と試料

Table 1.　Relation between the degree of drying (γ) and drying time (t_d)

t_d	0	1	2	3	4	5	6	7	8	10	12
γ	1	0.937	0.867	0.822	0.787	0.742	0.703	0.663	0.615	0.580	0.512

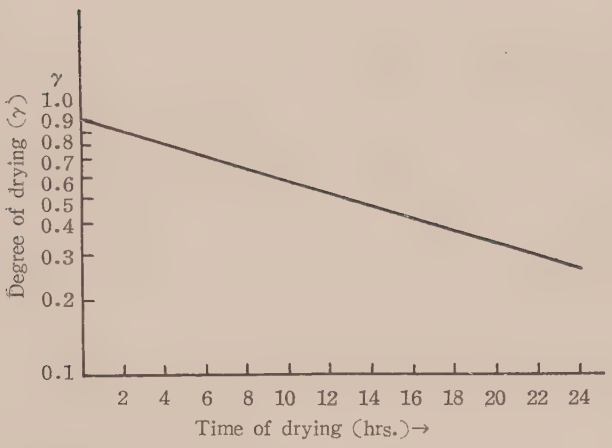


Fig. 2. Relation between the degree of drying (γ) and the time of drying (t_d)

秋イカの新鮮なものの内臓を除去し，天日乾燥で急速に含水量53.8%とした試料を作つた。なお乾燥しない生のもの（含水量78.2%）及びスルメ製品（含水量19.4%及び25.2%のもの）をも比較実験のために試料とした。これら含水量の異る試料を第1図の如き恒温恒湿装置内におき，一定時間毎に試料の全水分量，結合水量，肉重量，V.B.-N量，pH値等を測定した。全水分量は常法により，結合水量（"g"）は大八木法[2]により乾物1g当りの結合水量（gm）として測定しV.B.-N量はWeber and Wilson 法により mg% として表し，pH 値はガラス電極により測定した。

2） 実験結果

実験結果は第2～6表，第3～7図の如くである。第3図の全水分量の変化をみるに，含水量50%以上のイカを関係湿度90～95%の如き高湿度においた場合はその水分量には余り変化はない。即ち高湿度では乾燥は余り進行しない。併しスルメの状態にまで乾燥した試料では却つて吸水する。第4図では結合水量の変化をみたが，その結果は区々で一定した傾向は認められなかつた。第5図の肉

Table 2. Chemical changes in squid meat which contained 53.8% of water (Left at 90～95% of relative humidity and 17° ± 2°C. of temp.)

Leaving days	Total water content (%)	Amount of bound water ("g")	V.B.-N (mg%)	pH	Weight of squid meat W_o	W_n	$W_n/W_o=\gamma$	Appearance of pigment cells (Tachiki's grade)
0	53.8	0.214	31.2	6.2	11.1	11.1	1.00	(A)
1	46.7	0.227	44.3	6.4		11.2	1.01	(B)
3	47.0	0.281	46.2	6.4		11.2	1.01	(D)
5	45.0	0.343	69.4	6.4		11.3	1.02	(D)
7	45.5	0.105	77.6	6.4		11.3	1.02	(E)
10	46.1	0.339	123.3	6.6		11.2	1.01	(E)
13	44.0	0.249	205.5	6.8		11.2	1.01	(F)
15	47.3	0.255	256.9	7.0		10.5	0.95	(F)
18	44.7	0.219	295.4	—		10.2	0.92	(F)

Table 3. Chemical changes in squid meat which contained 70.8% of water (Left at 90～95% of relative humidity 17° ± 2°C. of temp.)

Leaving days	Total water content (%)	Amount of bound water ("g")	V.B.-N (mg%)	pH	Weight of squid meat W_o	W_n	$W_n/W_o=\gamma$	Appearance of pigment cells (Tachiki's grade)
0	70.8	0.309	6.3	9.0	17.8	17.8	1.00	(A)
1	65.4	0.242	44.1	6.0		17.6	0.99	(C)
3	66.7	0.192	19.3	—		17.2	0.97	(D)
6	64.4	0.375	105.9	6.0		16.8	0.94	(E)
8	65.6	0.200	156.7	6.3		16.3	0.92	(E)
11	63.5	0.270	215.7	6.5		15.6	0.88	(F)
13	63.3	0.188	244.0	6.6		15.2	0.85	(F)
15	55.5	0.315	398.2	7.0		14.4	0.81	(F)
18	61.5	0.290	449.5	7.0		13.6	0.76	(F)

重量の変化をみるに含水量50%以上のものは肉質の分解のため少しずつ減少するが，スルメ製品となつたものは吸水のため却つて重量は増加してゆく。第6図においてV.B.-N量は含水量の多い70%のもの及び78%のものでは2～3日の間に腐敗臭を発し，それ以後は急激に増加する。これに対し，含水量50%のものは5～7日間までV.B.-N量の生成は緩慢で，その後の増加量も生干しイカ（含水量70%）に比すると少ない。スルメの状態となつた試料では吸水の結果，水分量が50%以上となつた頃よりV.B.-N量も増加し始めている。併し乾燥した肉についてV.B.-N量の絶対値でその肉の鮮度を表現することは困難で，むしろその比較値で鮮度の低下の速さを

Table 4. Chemical changes in squid meat which contained 78.2% of water (Left at 90～95% of relative humidity and 17° ± 2°C. of temp.)

Leaving days	Total water content (%)	Amount of bound water ("g")	V.B.-N (mg%)	pH	Weight of squid meat W_o	W_n	$W_n/W_o=\gamma$	Appearance of pigment cells (Tachiki's grade)
0	78.2	0.302	—	6.0	15.9	15.9	1.00	(A)
1	76.5	0.332	—	6.0		15.3	0.96	(D)
3	75.3	0.159	48.8	6.0		14.7	0.93	(E)
4	76.0	0.168	53.9	6.0		14.5	0.91	(F)
6	74.6	0.255	215.8	6.4		13.5	0.85	(F)
8	71.7	0.282	295.4	6.5		13.0	0.82	(F)
10	73.4	0.162	372.5	6.6		11.8	0.74	(F)
13	75.6	0.279	526.6	6.6		10.4	0.65	(F)
16	70.5	0.341	570.3	6.6		9.2	0.58	(F)

Table 5. Chemical changes in squid meat which contained 19.4% of water (Left at 90～95% of relative humidity and 17° ± 2°C. of temp.)
Note- Wo: The weight (g) of squid meat before leaving.
Wn: The weight (g) of squid meat after leaving of a definite time.

Leaving days	Total water content (%)	Amount of bound water ("g")	V.B.-N (mg%)	pH	Weight of squid meat W_o	W_n	$W_n/W_o=\gamma$	Appearance of pigment cells (Tachiki's grade)
0	19.4	0.238	60.6	5.8	5.3	5.3	1.00	(B)
1	21.7	0.298	53.0	5.8		6.6	1.25	(B)
3	25.9	0.272	53.3	6.0		7.5	1.42	(B)
6	27.4	0.205	68.0	6.2		7.9	..49	(C)
11	40.0	0.217	64.4	5.8		8.9	1.68	(D)
15	35.7	0.128	123.3	6.0		9.2	1.74	(E)
19	44.6	0.203	287.1	6.4		9.4	1.77	(F)
24	41.4	0.238	321.0	6.6		9.2	1.74	(F)
27	40.8	0.239	295.0	7.0		8.5	1.60	(F)

Table 6. Chemical changes in squid meat which contained 25.2% of water (Left at 90～95% of relative humidity and 17° ± 2°C. of temp.)

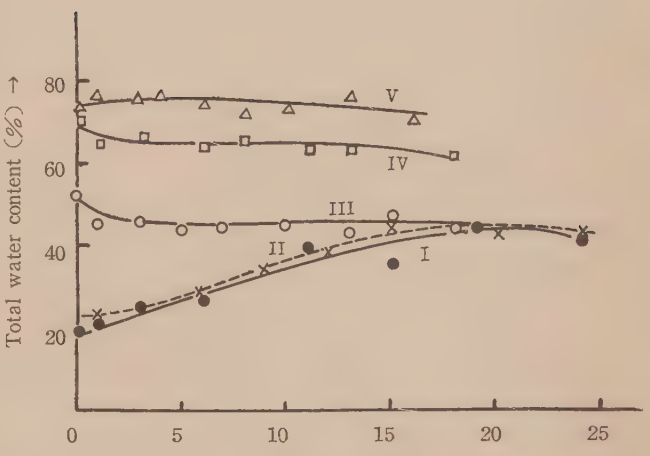
Leaving days	Total water content (%)	Amount of bound water ("g")	V.B.-N (mg%)	pH	Weight of squid meat W_o	W_n	$W_n/W_o=\gamma$	Appearance of pigment cells (Tachiki's grade)
0	25.2	0.226	52.2	—	4.0	4.0	1.00	(B)
1	23.5	0.214	55.7	6.0		4.4	1.10	(B)
3	25.5	0.234	59.6	6.0		5.5	1.38	(B)
6	28.9	0.206	58.0	6.0		5.9	1.48	(D)
9	34.3	0.228	66.2	6.0		6.3	1.58	(D)
12	38.4	0.137	73.4	6.0		6.5	1.63	(E)
15	44.5	0.233	155.3	6.4		6.7	1.68	(F)
20	42.9	0.198	334.6	6.6		6.5	1.63	(F)
24	42.0	0.239	369.5	6.8		6.2	1.55	(F)

知る程度である。第7図のpH値の変化もV.B.-N量の変化と略々相対的に変化しているが，pHのみでも乾燥魚肉の鮮度を知ることは出来ない。イカ乾燥品即ちスルメの鮮度を知るには前報[3]に述べた如くイカ表皮の下層にある色素細胞の状態により判定するのが最良で，色素細胞の状態を立木氏標準[1]に従つて第2～6表の右欄に併記してある。

以上の実験結果からイカ肉の含水量が約50～55%以下の如く少い場合は関係湿度90～95%のような高湿度の環境におかれてもムレの状態に達するまでの時間は長いが(5～7日後)含水量の多い場合は2～3日の中にムレの状態になつてしまう。故にスルメ製造の初期においては出来るだけ急速に含水量が少くなるまで乾燥してムレ難い状態にしておかねばならない。又スルメのように一度含水量の少ない乾製品となつたとしても之を高湿度の環境に長時間おけば吸水の結果腐敗する恐れは充分あるから，晴天の日を選んで出来るだけ早い機会に再乾燥する必要がある。

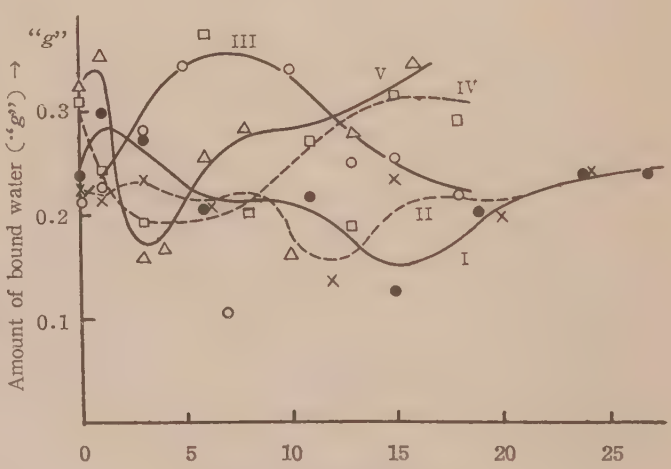
Ⅲ イカの乾燥度とムレ発生との関係

さきに川上[5]は魚の乾燥品の腐敗の進行を乾燥過程中と乾燥後の貯蔵過程中とに分け考察した。即ち，乾燥過程中の腐敗速度は乾燥時の温度(θ)と乾燥度(γ)との函数と考え，これらが乾燥の時間と共に変化することから，それらの積分値で腐敗速度が表わされるとしている。又貯蔵過程中の腐敗は貯蔵中の乾燥度(γ_s)を一定と考え，貯蔵温度(θ_s)と貯蔵時間(t_s)の積で表わされるとしている。而して今Sを乾燥時間(t_d)と貯蔵時間(t_s)との和の時間の経過後に



I —●— Squid meat (water-content 19.4%)
II …×… 〃 (〃 25.2%)
III —○— 〃 (〃 53.8%)
IV —□— 〃 (〃 70.8%)
V —△— 〃 (〃 73.2%)

Fig. 3. Changes in the amount of total water in squid meat



I —●— Squid meat (water-content 19.4%)
II …×… 〃 (〃 25.2%)
III —○— 〃 (〃 53.8%)
IV —□— 〃 (〃 70.8%)
V —△— 〃 (〃 73.2%)

Fig. 4. Changes in the amount of bound water in squid meat

おける腐敗の程度，S_oを$t_{\bar{a}}=0$における魚体の鮮度とすれば$\frac{S}{S_o}$は

$$log\frac{S}{S_o}=\int_o^{t_{\bar{a}}} v(\theta)\lambda(\gamma)\delta t + v(\theta_s)\lambda(\gamma_s)t_{\bar{a}}\cdots\cdots\cdots(1)$$

で表わされるとしている。なおv,λはθ,γ並びにθ_s,γ_sのそれぞれの係数である。

著者等は前項IIの第2～6表の結果から，川上の式(1)を応用してムレ発生とイカの乾燥度との関係を考察した。即ちイカ肉のムレの発生し始めの鮮度をS_1，確実にムレの状態を呈している時の鮮度をS_2とし，それら鮮度をpH及び谷川[3]並びに立木[4]が行つた色素細胞の状態から判定した。而してS_nに至る迄の時間(T)を(t_a+t_s)とし，S_oを$t_a=0$即ち生イカの表皮下層の色素細胞の状態を基準として乾燥度(　)とムレ発生係数λ(　)との関係及び　とムレ発生の初期並びに充分にムレの発生の認められる時期迄の時間(T)との関係を求めた。即ち前項IIの実験において乾燥過程中の温度(θ)は20°C であつて，乾燥t_d時間後の乾燥度(　)は前項の第1図より求めることとした。次に種々含水量，乾燥度を変えたイカ肉をθ_s=20°C，関係湿度90～95%の条件で放置した場合のムレ発生までの時間(t_s)と乾燥度(γ)との関係を第2～7表のpH及び色素細胞の状態よりのイカの鮮度鑑定結果を用いて第7表(a)(b)に示した。こゝで乾燥度0.5以上即ち未だ乾燥が充分でないものを高湿度の環境においた時は前述の如くイカ肉は全水分量の変化なく，又肉重量の増減も少い故，放置中の乾燥度γ_sは一定であると考え，川上の(1)式を解くために$\frac{1}{v(\theta)}log\frac{S}{S_o}=T$とおくと

γ=1.0，0.9，0.8……に対し，Tはそれぞれ

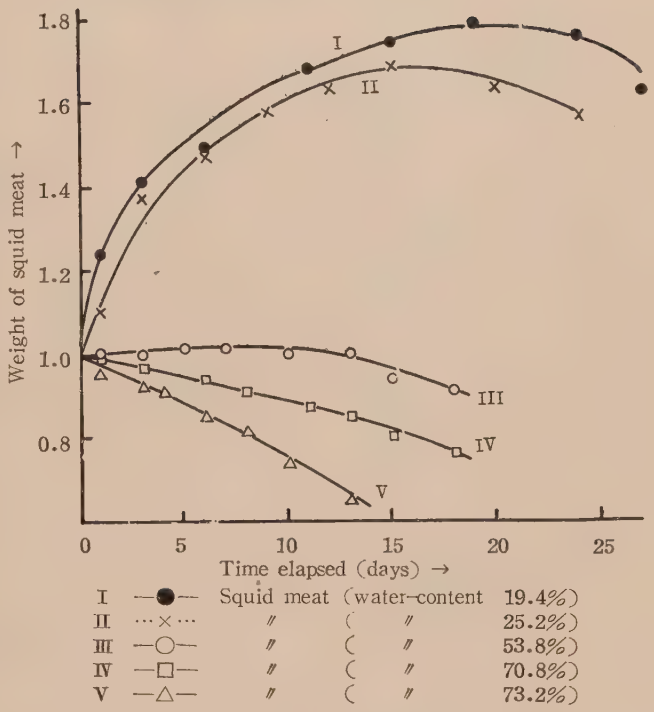


Fig. 5. Changes in the weight of the squid meat

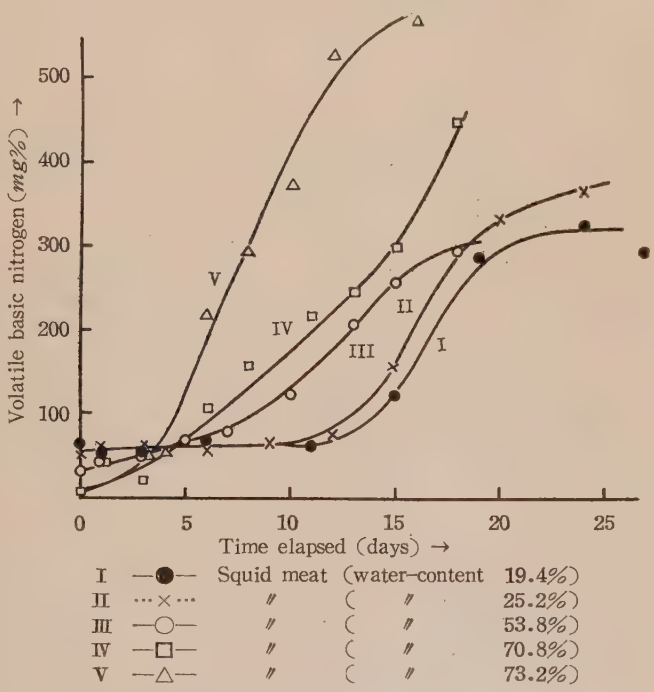


Fig. 6. Changes in the amount of volatile basic nitrogen (V. B.-N) in squid meat

$T=\lambda(1.0)\delta t_{10.10}$

$T=\lambda(1.0)\delta t_{10.7}+\lambda(0.9)\delta t_{9.9}$

$T=\lambda(1.0)\delta t_{10.7}+\lambda(0.9)\delta t_{9.8}+\lambda(0.8)\delta t_{8.8}$

……

の如き値をとる。こゝに $\delta t_{m.n}$ は $\gamma_s=\frac{n}{10}$ なる時，乾燥中 $\gamma=\frac{m}{10}$ の区間を通過するに要する時間であり，第1表及び第2図より求められる。又生のイカ（$\gamma=1.0$）のムレ発生係数 $\lambda(\gamma)$ を $\lambda(0.1)=1$ とおくと

$$T=\lambda(1)\delta t_{10.10}\cdots\cdots\cdots\cdots(2)$$

となるから，この(2)式を λ について解くと

$\lambda(1.0)=1$

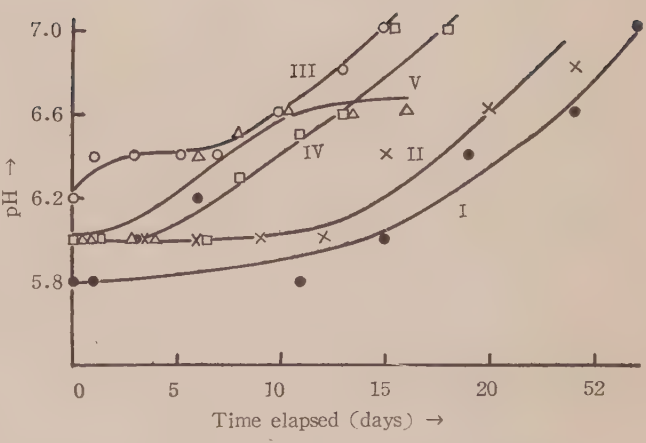
$\lambda(0.9)=\frac{1}{\delta t_{9.9}}(T-\delta t_{10.9})$

$\lambda(0.8)=\frac{1}{\delta t_{8.8}}\{T-\delta t_{10.8}-\lambda(0.9)\delta t_{9.8}\}$

$\lambda(0.7)=\frac{1}{\delta t_{7.7}}\{T-\delta t_{10.7}-\lambda(0.9)\delta t_{9.7}-\lambda(0.8)\delta t_{8.7}\}$

……

の如くになる。これらの各式に第1表より t 及び第7表より t_s の数値を求めて代入し $\lambda(\gamma)$ の値を求めた。即ち T はムレ発生までの時間で，$\gamma=1.0$ の時は24時間であり，$\gamma=0.9$ の時は $T=58$ 時間であり以下第7表記載の時間の如くである。なお $\delta t_{m.n}$ は前記定義に従い第1表及び第2図より $\delta t_{10.9}=1.8$hrs, $\delta t_{10.8}=4$hrs であることがわかる。これらの値を用いて各種乾燥度（γ）に対するムレ発生係数 $\lambda(\gamma)$ の値を求めると，第8表(a)(b)の如くであり，それらを図示すると第8図の如くである。第8図（次頁）より明らかなように γ と $\lambda(\gamma)$ との関係は対数曲線で表わされる。即ち γ の減少に対し，$\lambda(\gamma)$ の値は急激に減少するのでイカの含水量即ち乾燥度（γ）かムレの発生速度に及ぼす影響の大きいことがわかる。例えば(a)の場合（ムレ発生の初期まで）には $\gamma=0.7$ になると $\lambda(\gamma)$ の値は $\gamma=1.0$ の時の約 $1/10$ になり，(b)の場合（ムレが起つていることが充分認められる時期まで）には $\gamma=0.5$ になると $\lambda(\gamma)$ の値は $\gamma=1.0$ の時の約 $1/10$ になつている。それ以下の γ の値では大差



I —●— Squid meat (water-content 19.4%)
II ···×··· 〃 (〃 25.2%)
III - -○— 〃 (〃 53.8%)
IV —□— 〃 (〃 70.8%)
V —△— 〃 (〃 73.2%)

Fig. 7. Changes in the pH value in squid meat

Table 7. Relation between degrees of drying (γ) and the time to putrefafaction "mure" (t_s)

(a) The case of incipient putrefaction "mure"

γ	1.0	0.960	0.806	0.520	0.39
ts	24	36	96	240	

(b) The case of later period of putrefaction "mure"

γ	1.0	0.960	0.806	0.520	0.39
ts	48	120	168	276	360

Table 8. Relation between degrees of drying (γ) and the coefficient of the time to putrefaction "mure" ($\lambda(\gamma)$)

(a) The case of incipient putrefaction "mure"

γ	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5
$\lambda(\gamma)$	1.0	0.37	0.19	0.13	0.06	0.02

(b) The case of later period of putrefacion "mure"

γ	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5
$\lambda(\gamma)$	1.0	0.93	0.35	0.18	0.12	0.95

はない。それ故，悪天候に逢つてもスルメをムレさせないで製造するには一応急激に $\gamma=0.7\sim0.5$ まで乾燥することが必要である。

次に上記の実験結果の $\lambda(\gamma)$ の値及び $v(\theta)$ を用い，川上の式(1)より生イカが乾燥され各種含水量（乾燥度）になつてから高温多湿の環境に放置された場合，それら各種の乾燥度のイカが高温(30°C)及び中温（20°C)に放置された場合，ムレを発するに至るまでの時間（T）（生イカから乾燥してムレが発生する迄の時間）を求めた。なおこの場合，川上の式(1)中の温度係数 $v(\theta)$ として，谷川[1]等がイカ肉の腐敗の研究において得た温度係数，即ち高温(30°C)での $Q_{10}=1.5\sim1.6$，中温（20°C)での $Q_{10}=2.0\sim2.2$ より，高温の時の $v(\theta)=1.5$，中温の時の $v(\theta)=2.0$ を用い T の値を計算した。こゝに得られた結果を第9表(a)(b)に示した。更に第9表の数値を半対数方眼紙にプロットしたのが第9図である。

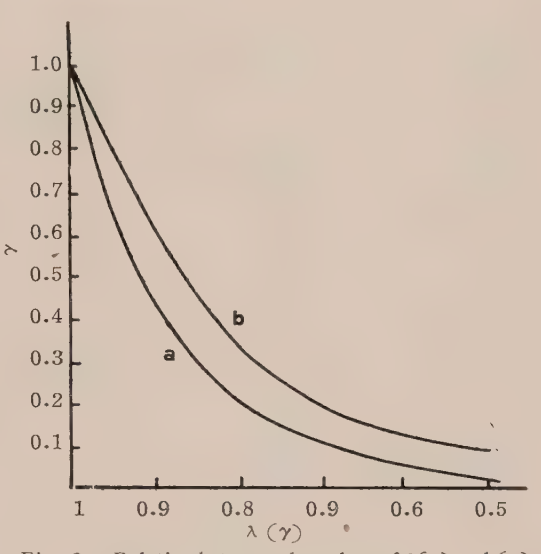


Fig. 8.　Relation between the values of λ(γ) and (γ)
a.　Incipient putrefaction "mure"
b.　Later period of putrefaction "mure"

Table 9.　Relation between the values of γ and T

(a)

γ	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5
T	24	96	144	188	232	264

(b)

γ	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5
T	18	72	108	141	174	198

第9図より更に一般によくわかるようにイカの乾燥度とムレ発生までの時間を区数尺で表わしたのが第10図（次頁）である。この区数尺からみると急速に乾燥度 0.7 まで乾燥しておけばその後，温度 20°C，関係湿度90～95%の環境に放置されても156時間（6日半）まではムレないし，又乾燥度 0.5 まで乾燥しておけば 360 時間（15日間）までムレないことがわかる。又 30°Cに放置される時は右の区数尺を用いればわかる。

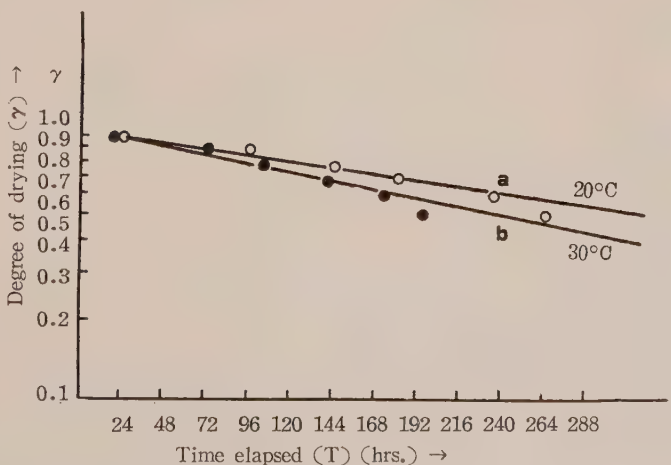


Fig. 9.　Relation between the values of γ and T

Ⅳ　スルメ乾燥初期における強制通風による脱水

著者等は前項の実験においてイカを乾燥する場合急速に乾燥度(γ)を0.7～0.5までに乾燥すればその後悪天候に逢い高温多湿の環境に置かれたとしてもムレを起し難いことを認めた。こゝで乾燥初期の急速乾燥を強制通風のみによつて

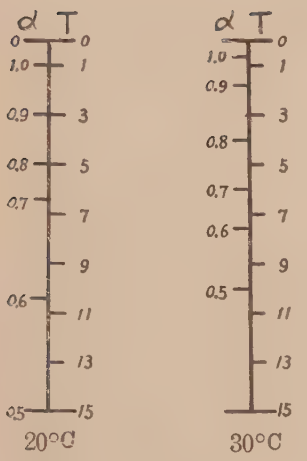


Fig. 10. Scales showing γ and T

経済的に行つた場合の効果を検討した。

1) 試料

函館近海で漁獲された鮮度極めて良好の秋イカをスルメ製造の時と同じように処理し，胴部のみを開いた。

2) 実験方法

第1図の如き恒温恒湿装置に小形扇風機を装置し，風速を自由に加減する如くした。この装置を用い，室内の温度を20°C又は30°Cとし，関係湿度を夫々70，80，90%に保持した。又風速は7.4*m/sec*及び11*m/sec*とした。なお風速は装置内に風車式風速計を吊下して3回の測定値を得，その平均値をとつた。通風中一定時間毎に試料の重量及びムレ発生の有無をみた。

3) 実験結果

実験によつて得られた結果を図示すれば第11図の如くである。同図(a)は温度30°C，風速 7.4*m/sec* で通風した場合で，関係湿度(R.H.)を70，80，90%と変えてみたが，R.H. 70%の時には急速に乾燥度(γ) 0.7

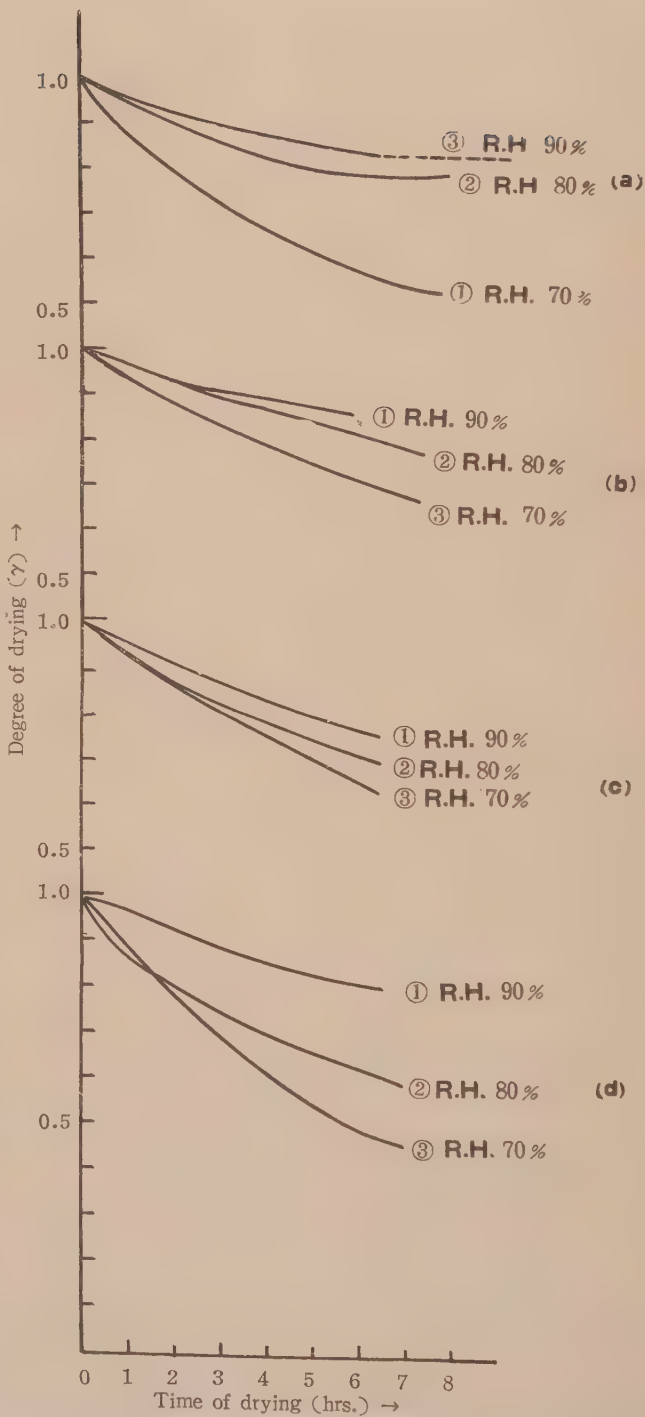


Fig. 11. Relation between the degree of drying (γ) and the time of drying (T) by air blast

まで乾燥するが，R.H.80～90%となれば約6時間後でも乾燥しなかつた。特にR.H.70%の時には順調に乾燥が進むため，外観も良好であつたが，R.H. 80～90%では24時間後にイカのヒレの部分に色素が溶出して赤変し，明らかにムレの現象を呈した。尙ムレの程度はR.H.90%の方が80%の場合に比し著しかつた。同図(b)は(a)と同条件で温度20°Cとした場合の乾燥状態である。その結果は(a)と略々同じであつた。併しR.H.80～90%におけるムレの発生は30°Cの場合より軽度であつた（色素細胞の状態の観察等から）。次ぎに同図(c)は温度30°C，風速11*m/sec*で各関係湿度についての結果であるが，(a)の場合と異り，R.H.80%以下では急速に$\gamma=0.7$まで乾燥されるのに対し，R.H. 90%では乾燥は行われなかつた。このことからみても風速が大となれば乾燥速度に影響をもたらすことは明らかである。同図(d)は(c)におけると同条件で温度を20°Cとした時の乾燥状態を示したものであるが，(c)と略々同じ結果であつた。この場合もムレは各湿度の場合とも発生しなかつた。これは恐らく温度が低かつたためであろう。

以上の実験結果を水分含有量の指標となる乾燥度（γ）を用いて考察すると次のようになる。今乾燥度（乾燥歩留）γは前述の如く$\gamma=\frac{W}{W_0}$とすると（W_0は乾燥前のイカ重量，Wは一定時間乾燥後のイカ重量），この式の両辺の対数をとれば　$log\frac{W}{W_0}=log\gamma=e^{-Nt}$ ……(3)　となる。こゝで第11図(a)(b)(c)(d)の数値を(3)式に代入して$log\gamma$とtとの関係を求めると第12図(a)(b)(c)(d)の如くになる。こゝで第12図で$\gamma=0.7$即ちイカ肉の水分を70～75%まで乾燥されるに要する時間を求めた結果は第10表の如くである。又(3)式のN（乾燥速度係数）を第12図から求めると第11表の如くになる。第11表中*印は第12図(d)においてR.H.80%の時乾燥開始後3時間目に曲折点があり，この曲折点を境としてその傾斜を求めたところ，初期では$N=0.0198$，後期で$N=0.0105$であり，その平均値をとつたことを示したものである。このことから考えるに風速が大となつて11.0 *m/sec*となり，温度が30°CとなればR.H.が80%でも乾燥速度が増加することを示すものである。併し風速が弱くても(7.4*m/sec*)，R.H.が70%であればNは0.0182となり，乾燥速度は著しく増加する。

こゝで強制通風を行わないで先に谷川[1]等が行つた実験結果のうち，今回行つた実験とその条件の近い20°～24°Cで乾燥した場合の乾燥速度係数をのせると第12表の如くである。第11表と第12表を比較すると強制通風を行つた場合は何等人工的に湿度を上昇させなくともその乾燥速度を幾らか大にすることが出来ることがわかる。

以上の実験結果から，たとえ30°Cの如き高温であつても，R.H.70%の場合は風速が7.4*m/sec*以上，又R.H.が80% の場合は風速が11*m/sec*以上に通風すればスルメ製造時一応，乾燥度（γ）0.7迄急速に乾燥出来，ムレを起し難く出来る。

V　各種水分量を有するイカ肉を高濕度（90～95%）に放置した際のV.B.-N量の変化及び有機塩基の消長

魚介肉が自然腐敗する場合にその含有水分量の多寡によつて腐敗に関与する細菌叢が異なることは既に報告されている[6]。従つて斯様な細菌叢の差異により含水量の異なるイカ肉腐敗の結果，産生される有機塩基の種類に差異が生ずるものと考えられ，或は少くとも有機塩基の生成状態には差異があると考えられる。

そこで此の点を検討するため各種水分量を有するイカ肉（Ⅰ.19.4%，Ⅱ.25.2%，Ⅲ.53.8%，Ⅳ.70.8%，Ⅴ.73.2%）を90～95%の湿度の下に放置し，経過時間毎にその揮発性塩基窒素量(V.B.-N)及び有機塩基の種類をペーパー・クロマトグラフ法[7]で測定した。その結果は第13図に示す如くである。即ちⅠ試料ではアミルアミン，カダベリン，チロシン，ヒスチジン，チラミン，Ⅱ試料ではアミルアミン，β-フェネチルアミン，カダベリン，チロシン，ヒスチジン，Ⅲ試料ではアミルアミン，β-フェネチルアミン，ヒスチジン，チロシン，イミダゾール酢酸，Ⅳ試料ではアミルアミン，カダベリン，ヒスチジン，チロシン，イミダゾール酢酸，Ⅴ試料ではアミルアミン，カダベリン，β-フェネチルアミン，ヒスチジン，チロシン，イミダゾール酢酸が検出された。

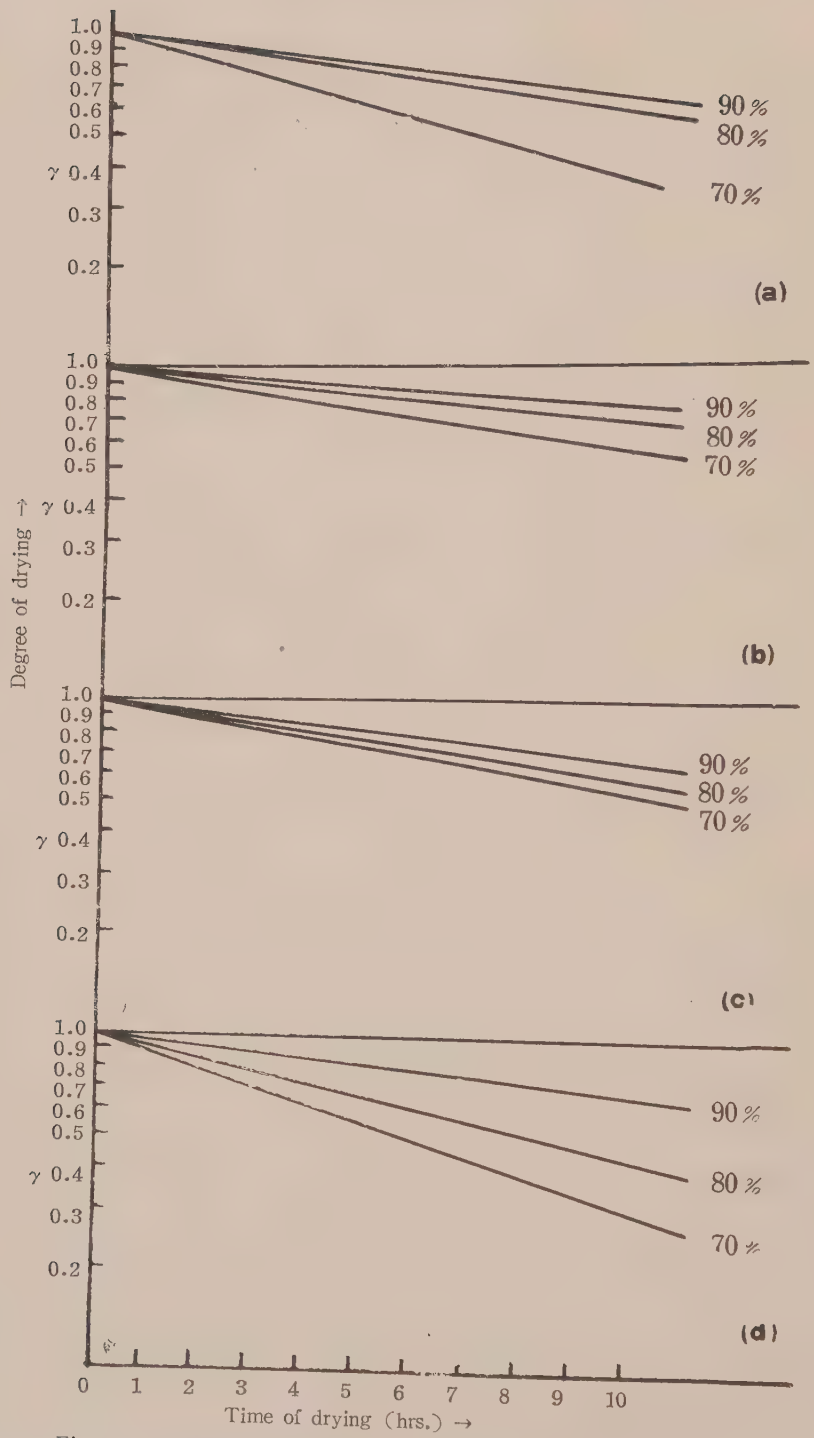


Fig. 12. Relation between log of degree of drying (γ) and the time of drying (t) by air blast

上記の結果中V試料は既に著者の一人谷川の行つた実験結果[8]と一致し，又其の後行われた村田[9]による実験結果とも略々一致している。

検出された有機塩基の種類は試料の含水量が異なつても著しい差異は認められないが発現の順序には不同があり，水分量の差異によつてイカ肉の腐敗過程に差異のあることが窺える。併しIII,IV,V試料とI,II試料ではV.B.-N生成状態，pHの変化並びに有機塩基の種類等が幾分異つており，III,IV,V試料ではイミダゾール醋酸 β-フェネチルアミンが検出されている。此の事より或る水分量を境として腐敗に関与する細菌叢が異なり，腐敗生産物が異つてくるのではないかと考えられる。即ち本実験結果では細菌叢を異らしめる水分の境界点は55%近辺にあるものと思われるが，イカ肉の結合水と自由水の関係を検討した実験結果で結合水領域の変化をうける限界点が略々50%前後である[10]こと，及びイカ肉の脱水による変性限界点が同じく此の程度の含水量[11]であると云う諸事実とを併考すれば極めて注目される。

又各試料では腐敗過程を通じて有機塩基は発現乃至は消滅の過程を辿つたが，全般にpH値が5.8～6.0にあつたので有機塩基の貯溜には好適であつたと思われる。

以上の実験結果よりスルメ製造に当つて製造途次の原料は，その水分量が50～55%近辺に達するまでは高湿度(90～95%)中に3日間以上放置することは出来ず，更に

Table 10. Time elapsed to $\gamma=0.7$ from various conditions of drying

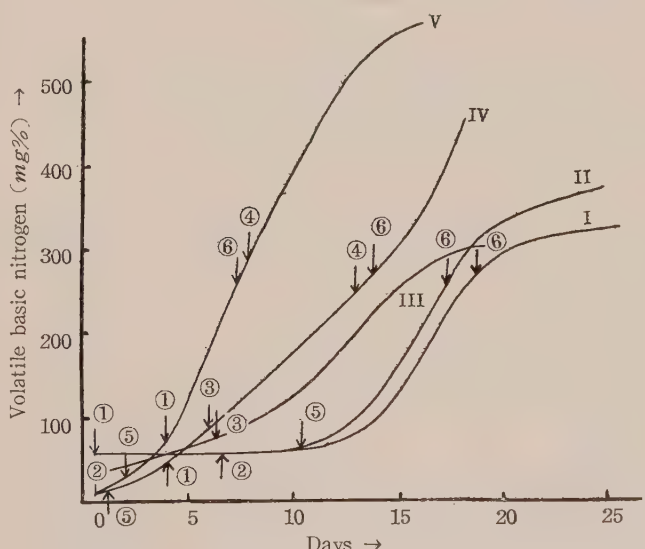
Wind velocity ($v=m/sec.$) \ R.H. / Temp. (°C)		70%	80%	90%
74	20	6.0	9.0	above 11
	30	3.5	7.5	9.5
11.0	20	5.2	6.0	8.0
	30	3.0	4.4	9.5

Table 11. Coefficients of drying velocity (N) from various conditions of drying　Note: *The values are expressed as average, since the figure is consisted with two lines those having the values of N of 0.0198 and 0.0105.

Wind velocity ($v=m/sec.$) \ R.H. / Temp. (°C)		70%	80%	90%
7.4	20	0.0111	0.0076	0.0057
	30	0.0182	0.0090	0.0070
11.0	20	0.0128	0.0109	0.0084
	30	0.0225	0.0157*	0.0073

Table 12. Coefficient of drying velocity from the condition of drying without air blast

Temp.(°C.) \ R.H.	70%	80%	90%
20 ～ 24	0.0125	0.0071	0.0046



① Histidine. ② Tyrosine. ③ Imidazol-acetic acid. ④ β-phenethylamine. ⑤ Indol. ⑥ Cadaverine.

I. Squid meat, water content 19.4%; II. 25.2%; III. 53.8%; IV. 70.8%; V. 73.2%

Fig. 13. Change in V. B.-N and amines in the course of decomposition of squid meat having various water content

製品となつた後も10日間以上放置すれば腐敗することが認められ，又原料イカは可及的速かに50～55%以下の水分量まで乾燥する必要がある。

要　　約

種々の含水量を有するイカ肉を90～95%の関係湿度の下に放置し，その腐敗過程の状況を観察し，又強制通風によるイカ肉の乾燥について実験した結果を要約すれば次の如くでなる。

1) イカ肉の水分含量が50～55%以下となれば腐敗の進行は緩やかとなる。

2) イカ肉の乾燥度(γ)が0.7（含水量55%）以下となれば腐敗に到達する時間は生イカの腐敗する時間の$^1/_{10}$となる。

3) 從つて悪天候等の状況を考慮して何等かの方法によりイカ肉の初期乾燥程度を$\gamma=0.7$以下としなければならない。此のため強制通風による乾燥法を考究し，関係湿度が80%以下となり，風速11*m/sec*以上とすればムレの発生は阻止されることをみた。

4) 含水度を異にするイカ肉が腐敗する際，生成する有機塩基類は種類の差異は認められないが，生成の程度には差異があり50～55%近辺の含水量を境として腐敗の様相を異にする。

文　　献

1) 谷川・秋場・沼倉(1954): 北大水産彙報 4 (4), 323.
2) 秋場(1951): 同誌. 1 (3,4), 157.
3) 谷川・元広・富田(1956): 同誌 7 (2), 165.
4) 立木(1951): 水検月報 (31), 4.
5) 川上: 魚体乾燥についての物理学的研究. 187p. (自費出版).
6) 相磯・中島(1949): 千葉大学腐研報告 (2), 3p.
7) 佐竹一夫(1953): クロマトグラフ. 98～102p. 東京: 共立全書.
8) 元広・谷川(1952): 北大水産彙報 3 (2), 154.
9) 村田(1956): 1955年度文部省綜合研究報告集録. (農学篇) 225p.
10) 谷川外(1956): 北大水産彙報 7 (1), 49.
11) 秋場(1955): 日水誌 20 (10) 937.

SOME EXPERIMENTS ON THE VARIABILITY OF HORIZONTAL PLANKTON HAULS AND ON THE HORIZONTAL DISTRIBUTION OF PLANKTON IN A LIMITED AREA*

Masateru ANRAKU
Faculty of Fisheries, Hokkaido University

The patchiness in distribution of plankton has long been recognized by many workers. If it occurs in an area surveyed, the variability of catches may become more complicated by reason of this uneven distribution of plankton in addition to the technical errors. The present paper deals with the variability of catches in horizontal tows with fish-larva net and in high speed tows with Handy Underway Plankton Catcher, and with a preliminary observation whether the distribution of planktonic animals is statistically random or non-random in a limited area.

I. The variability of catches obtained with the two models of Handy Underway Plankton Catchers

Use of the underway plankton sampling apparatus has been expanded as a technique for ecological survey of marine plankton; as a matter of course the variability of catches by this method has been taken into consideration. Barnes (1951) made experiments on the two models of the Hardy Plankton Indicator, finding that the values of the coefficient of variation are not greater than those for horizontal net hauls. The present experiments pertain to the statistical analysis of catches of three series of tows with different types of Handy Underway Plankton Catcher, Models I and II (Motoda, 1954), so as to assess the sampling variation.

Barnes (1951) reported that the ratio of 1 : 6 between the area of mouth opening of the instrument and the area of filtering gauze was sufficient for filtering the theoretical quantity of water. The ratios of the opening to the gauze in the present catchers are much larger (1:37 in model I; 1:114 in model II) than those of the Hardy Indicator. The nets of both catchers were made of no. 32 silk grit gauze (31 meshes per linear inch), and it has been proved that there was almost complete absence of any clogging of silk gauze during the present experiments.

Two models of the catchers were towed simultaneously in parallel but about two meters apart. Each tow was continued for ten minutes at a nominal speed of 7 knots, and then the catches were kept separately for analysis. The catches taken with the small catcher were always multiplied by 6.25 (the ratio of areas of inner openings) for comparison with those taken with the large catcher throughout the present experiments. The

* 水産庁委託対馬暖流調査報告 No. 6

logarithmic values of the catches were used instead of the actual number in the analysis of variance, since the standard deviation increases almost linearly with the mean catch.

Series I

A tow of ten minutes' duration repeated five times in the same course off the Port of Hakodate on October 7, 1954. Three groups of organisms, Copepoda, *Sagitta* and *Oikopleura*, were included enough for the analysis.

The details of the analysis of variance are given in the following table (table 1).

Table 1. Analysis of variance

Source of Variation	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square
Main effects:			
Species (S)	2	0.8860	0.4430
Tows (T)	5	0.6809	0.1362
Catchers (C)	1	0.1961	0.1961
First order interactions:			
S × T	10	0.4576	0.0458
S × C	2	0.1382	0.0691
T × C	5	0.0482	0.0096
Second order interaction:			
S × T × C	10	0.3450	0.0345
Total	35	2.7520	

The values for first order interactions, S×T and T×C, are not significant when tested against second order interaction. The catcher mean square is significant when tested against S×T×C. However, it is not significant against S×C, so that the high mean square for catcher seems to be largely due to a rather high S×C, and probably indicates the differential selection for particular species with particular catcher.

Series II

Two models of catchers were towed together five times off Cape Esan, south coast of Hokkaido, on October 21, 1954. Each tow lasted ten minutes. Only three groups were present in sufficient individuals for analysis, namely, Copepoda, Amphipoda and *Sagitta*.

The analysis of variance gives data in table 2.

Table 2. Analysis of variance

Source of Variation	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square
Main effects:			
Species (S)	2	8.7705	4.3853
Tows (T)	4	1.0532	0.2633
Catchers (C)	1	0.3830	0.3830
First order interactions:			
S × T	8	0.4299	0.0537
S × C	2	1.4587	0.7294
T × C	4	0.9564	0.2391
Second order interaction:			
S × T × C	8	0.6392	0.0799
Total	29	13.6909	

Now S×T is not significant but S×C is significant when tested against S×T×C. In this series, T×C is also slightly significant. The mean square for catchers is significant when tested against S×T×C, while it is not so against the values of both S×C and T×C, so that the high value of C appears to be largely due to the high values of both, especially to S×C. Thus the proportion of groups caught by each catcher throughout the tows again can be considered to differ significantly.

Series Ⅲ

These catches were taken off the Port of Hakodate on November 26, 1954. A large and a small catcher were towed simultaneously during ten minutes. There were five separate tows, and the abundant species were as in the preceding series, viz., Copepoda, Amphipoda and *Sagitta*.

The analysis from this series gives data shown in table 3.

Table 3. Analysis of variance

Source of Variation	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square
Main effects:			
Species (S)	2	0.6922	0.3461
Tows (T)	4	0.2592	0.0648
Catchers (C)	1	0.8670	0.8670
First order interactions:			
S × T	8	0.2446	0.0306
S × C	2	0.3828	0.1914
T × C	4	0.1507	0.0377
Second order interaction:			
S × T × C	8	0.2475	0.0309
Total	29	2.8440	

The values of C and S×C are significant against S×T×C. However, C is not

significant when tested against the value of S×C. Thus, the results are very similar to those of the previous series. However, the mean square for catchers in this series is rather higher than in the preceding two series, suggesting that the catch ratio of the large catcher to the small one is a little lower than the ratio of the mouth areas as discussed below.

The significant or slightly significant values of C in the present three series have been ascribed to high values of S × C, indicating the proportion of all groups caught by each model of catcher differed significantly. It seems therefore that each catcher has its own selection for species. The percentage of mean catches for three species in each series (fig. 1) indicates that Copepeda is collected abundantly by the large catcher, while Amphipoda is caught efficiently by the small one. The differential selection of species might have been caused by 1) the probable difference of depth of water layers filtered by each catcher, which was not determined, but supposed to never exceed one meter, 2) the difference of the behavior of stream lines around the opening of each catcher or 3) other uncertain effects.

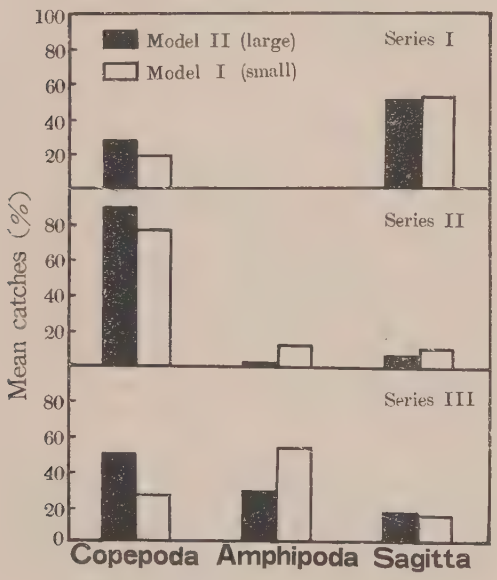


Fig. 1. The percentage occurrence of main species caught by each catcher
Oikopleura was abundant in Series I, but is excluded in this figure.

The percentage standard deviation of a single observation for each catcher was calculated respectively. The results are summarized in the following table.

No. of series	Large catcher (Model II)	Small catcher (Model I)
I	78.6	55.9
II	85.2	163.5
III	57.3	57.1

There is no remarkable difference between the values of the large and small catchers towed simultaneously in the same course except the value of small catcher in Series II.

The order of them is like that (76%) given by Barnes (1951) on the experiments using the small and the large models of Hardy Indicator, in ten-minute tows over the restricted area. Furthermore, it is of the same order as that (90%) shown by Winsor & Clarke (1940), when pairs of horizontal tows, taking half an hour, using nets of 12.7 cm in mouth diameter, are considered. It seems therefore that the plankton catchers give an estimate of the population as satisfactorily as nets in spite of their openings being smaller than those of the usual nets.

The values of variation of the large and small catchers in the other experiment made in Ishikari Bay in which simultaneous tows of both catchers were made five times successively along the course of the ship, that is, the tows were not made at the same area, were also calculated respectively as 350% (model II) and 735% (model I). These are much larger than those obtained in a restricted area. This increase in the values is caused by the change in population represented by the high value of $S \times T$ interaction. The results are identical with those obtained from experiments made by Barnes (1951).

A comparison of the amount of catches caught by the large and small catchers was then made concerning all the series. The mean ratios of the catches of the large catcher to those of the small one were obtained in logarithmic values and then converted into actual number. Three standard deviation limits were also calculated from the analyses of variance as the error to be attached to those ratios.

The results of calculations are given in the following table.

No. of series	Mean ratio of catches obtained	99% fiducial limits
I	3.03	1.30 - 7.08
II	4.31	1.73 -10.72
III	2.73	1.67 - 4.47

The ratio of the areas of inner openings between large and small catchers is 6.25. Assuming that the catchers are functioning effectively this ratio is used for comparison. The mean ratios of catches in each series are smaller than the ratio of the opening of both catchers, and this (6.25) lies outside the 99% fiducial limits in Series III. Therefore, it can be suggested that the larger catcher can not always catch the number of organisms proportional to its opening size as compared with the smaller one.

The Handy Underway Plankton Catcher is originally designed to use in simplest and easiest way for fishermen. It is not equipped with any sinking vane so that it may be hauled with ease by hand. One peculiarity of this instrument is in the structure of the opening on both sides of the head-piece to introduce inflowing water. It is constructed differently from the Hardy Indicator or other similar recent underway samplers. The complexity of way of inflowing water makes impossible the exact estimation of amount of water entering into the inside net in the present catcher which may vary with great complexity according to the towing speed.

II. Horizontal tows of stramin fish-larva net

At present in Japan, the horizontal surface tow of the stramin net is standardized as a routine procedure to collect the larvae or eggs of fishes. The standardized net is 130 cm in mouth diameter, 450 cm in length, made of stramin in the upper 300 cm and of bolting silk, GG 54, in the lower 150 cm.

Experiments were made to find out the difference of variability of catches between the standard 10 minutes' tow and the 20 minutes', so as to ascertain the reliability of standard ten-minute tow. Two nets of the same size were towed at the side of the ship, one on the starboard and the other on the port, each being kept about one meter distant from the side of the ship. The catches were kept separately for analysis. Logarithmic values of catches were used also in these experiments.

In the first place, ten-minute tows were repeated three times in the same course, and six independent samples were obtained. Secondly, one net was hauled up on board the ship ten minutes after the start, while the other one was towed continuously for an additional ten minutes. Collections in the same way were repeated three times, yielding six independent samples. In another area, there was an opportunity for making such collections, yielding twelve independent samples. Thus, sum totals of materials reached to twenty-four. For convenience in analysis two groups of organisms, fish eggs and fish larvae, were calculated for the study.*

Series I

The first experiments were carried out off Furubira, western Hokkaido, from 16:28 to 17:14 hours on June 28, 1955. Three tows, each tow lasting ten minutes, were taken as far as possible over the same course at constant speed (2 knots).

Firstly, the hypothesis that catches caught on each side were sampled from the same population was tested. The values of F_o (the ratio of variance of catches on each side) for the species caught in sufficient number were calculated as 2.55 for mackerel eggs and 4.74 for unidentified eggs (probably eggs of plaice).

The value of F_2^2 (0.05) is 19.0, and the assumption that both species of eggs caught by the net of each side of ship belong to the same population is not rejected.

After the first series of experiments, three tows of the second experiments (starboard net - ten minutes; port net - twenty minutes) were made by running the same course from 17:27 to 18:44 hours. The same two species of eggs were used for analysis of variance under the above described assumption. The catches of ten-minute tows were doubled for comparison.

The analysis of variance gives data shown in table 4.

* Thanks are due to Mr. O. Sano of the Hokkaido Regional Fisheries Research Laboratory for counting this set.

Table 4. Analysis of variance

Source of Variation	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square
Main effects:			
Species (S)	1	12.1002	12.1002
Tows (T)	2	0.0933	0.0467
Distances (D)	1	0.0184	0.0184
First order interactions:			
S × T	2	0.1252	0.0626
S × D	1	0.0184	0.0184
T × D	2	0.0261	0.0131
Second order interaction:			
S × T × D	2	0.0856	0.0428
Total	11	12.4672	

The mean squares for tows and distances are not significant (the 0.05 level is accepted throughout) nor are the first order interactions when tested against the second order interaction, so that there was no significant difference between the tow or distance, that is, the catches were reasonably proportional to the distances of tows so far as the present materials are concerned.

Then the analyses of variance are made for ten- and twenty-minute tows separately. The results show that the tow mean squares are not significant against residuals in each case. The percentage standard deviation of a single observation for a ten-minute tow is then calculated as 81% and for a twenty minute tow as 35%.

Series II

The first experiments were carried on off Cape Shiriba, Yoichi, on the west coast of Hokkaido, from 00:05 to 00:52 hours on June 29, in the same way as in Series I. The values of F_0 for three abundant species, mackerel eggs, unidentified eggs and larvae of anchovy, are calculated respectively as 11.17, 1.18 and 3.38 ($F_2^2(0.05)=19.0$). Thus the catches of each side were considered to be taken from the same population as in Series I.

Just after the previous three repeated tows, second tows were carried out from 00:55 to 02:00 hours in the same course. The abundant three species were used in analysis for studying the difference between ten- and twenty-minute tows.

The analysis of variance is then given in table 5.

Table 5. Analysis of variance

Source of Variation	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square
Main effects:			
Species (S)	2	6.1116	3.0558
Tows (T)	2	0.0489	0.0245
Distances (D)	1	0.0060	0.0060
First order interactions:			
S × T	4	0.2457	0.0614
S × D	2	0.0415	0.0208
T × D	2	0.1943	0.0972
Second order interaction:			
S × T × D	4	0.3468	0.0867
Total	17	6.9948	

The mean square for distance is not significant, so that there was no significant difference between the totals of catches of the different towing distances. None of the first order interactions are significant, so that the proportions of organisms caught did not vary with the tows or the distances, and further the proportion at two different distances did not vary with tows.

The analyses of variance for ten- and twenty-minute tows are then made respectively. The mean squares for tows are also not significant in each case. The percentage standard deviation of a single observation is 112% in the short tow and 52% in the long tow. The value of variation for ten minutes is about half that of twenty-minute tow.

The results of analysis of variance confirmed that the catches were proportional to the distances of tows, and there is no selection for species resulting from the difference of towing distance. Theoretically speaking, the percentage standard deviations of a single observation for twenty-minute tows should be half that of ten-minute, when one supposes that one twenty-minute tow is a random sample of two ten-minute tows.

In the present experiments the variation of the long tow is roughly $1/\sqrt{2}$ the short one, and the mean square for distances, when the catches of ten minute tow were doubled, is not significant against the value of second order interaction. Accordingly, no significant differences are observed between the catches of the tows, notwithstaning the twenty minute tow is not conceivable as the random sampling of two ten minute tows in the present experiments. That is to say, the catches caught by the ten-minute tow at a speed of about 2 knots represent the average population of fish larvae and fish eggs in the areas surveyed. Thus the prolongation of the towing distance does not vary the mean value of catches significantly, while the variation is decreased inversely proportional to the square root of degrees of prolongation.

The total number of species caught in the experiments by ten- and twenty-minute tows in both series is tabulated as follows:

	Series I		Series II	
	10 minutes	20 minutes	10 minutes	20 minutes
1st tow	8	8	9	9
2nd tow	4	6	6	9
3rd tow	3	7	8	12

Generally the species which occurred in twenty-minute tows are more abundant than those of the ten-minute, however it does not always follow that the species collected in the short distance tows are found also in the catches of long distance tows.

Recently, Senta (1955) made an observation on the stramin fish-larva net, and assumed that Nicholson's Competition Curve, $\frac{dn}{dt} = a\ (N-n)$, was conformed reasonably to the relation between the distance (time) of tow and the number of species caught, and for this reason he assumed that the twenty-minute tows would be more useful than ten-minute. The application of the present data to the above exponential equation showed the value of a to vary to a large extent, which must be constant, although the present collections were made within a short time and in very restricted region as far as possible. It seems therefore that Nicholson's theoretical model is not always applicable.

III. Horizontal distribution of plankton in a limited area

The patchiness of plankton distribution has been shown by Hardy & Gunther (1935) for Antarctic plankton, and by Hardy (1944) and his co-workers for the North Sea plankton. The interests of these studies, however, lay in the distribution of organisms over a wide area. On the other hand, according to the recent works of Barnes (1949, 1951 with Marshall), the variability of catches of plankton tows is not entirely accounted for by technical errors, but partly depends upon a non-random distribution of the organisms themselves in a restricted area. From this, the horizontal distribution in the limited area becomes a problem to be statistically studied.

The samples were taken by a hand pump fitted with 2 cm rubber hose. An end of the hose was lowered 100 cm beneath the sea level through a hole bored at the center of a board with an area of about 100 cm^2. This board was kept at a point about seven meters distant from the stern of the ship by the help of a bamboo pole in order to avoid the disturbance of water by the ship.

There was a bright sky and the sea was calm, but the ship was drifted very slowly by light air. Thus the samplings were performed continuously along a line. To estimate the volume of water pumped the simplest technique consisting of filtering the water through a small net into a tank of known capacity was used in this study. After filling up a tank, the pumping was repeated into another tank so as to collect the samples continuously through the experiments. The time of pumping required to sample 20 liters

of water was estimated at 90 seconds or so (± 10 sec.). The plankton materials caught through a bolting silk net were washed off carefully and removed into a bottle. The variation of the volume of water pumped was controlled within as narrow limits as possible. All individuals of organisms were calculated carefully under the binocular microscope, and so there are no sub-sampling errors.

Series I

In this series twenty samples taken at about 90 seconds interval were collected from a single constant depth, off Furubira, western Hokkaido, starting at 15:50 hours on June 28, 1955. Relative movement of water and ship, measured by means of a float, was 3.5 - 5.4 m/min., which corresponds to the transfer of ship from 5.4 - 8.1 meters during the collection for a single sample, 108 - 162 meters for collecting twenty samples. This small area of water has been commonly considered to maintain the same population of plankton in the sampling by net haul or by other methods.

The number of organisms calculated is shown in table 6. In this series, *Oikoleura* occurred abundantly in all samples. Copepoda was represented by such small species as

Table 6. Number of organisms occurring in each twenty liters of water taken by a consecutive pump samplings on board a ship drifting along a straight line

Series I (Time: 15:50 to 16:20)

Order of Sampling	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Copepoda	5	9	1	4	3	3	7	3	2	4	1	5	8	5	7	10	7	5	11	10
Amphipoda		1																		
Oikopleura sp.	22	20	13	35	10	27	45	47	42	38	24	50	36	51	42	39	42	25	41	27
Limacina helicina		3		1			1	1	1			1				1	1		1	
Eggs of mackerel		16		3							1								1	
Eggs of anchovy		141	3	35		4	1	2		5		2		2						
Calyptopis larva of *Euphausia*														1						

Series II (Time: 19:23 to 19:53)

Order of Sampling	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Copepoda	73	41	57	53	37	52	38	56	51	37	43	65	64	44	71	124	94	84	95	71
Amphipoda	11		1		3							1	3		1	2	12	10	11	5
Oikopleura sp.	177	52	89	68	68	67	42	64	54	56	46	47	50	37	42	55	44	47	36	23
Sagitta sp.										1										
Limacina helicina	1																			
Aglantha sp.	1																			
Eggs of mackerel	5	2	2	1	2	1	2	2		2	2				2	3	3	1	2	3
Calyptopis larvae of *Euphausia*	1212		35		3		6		2				2							
Brachyuran zoea			1									1					2			

Paracalanus, *Clausocalanus* and *Oithona*. A small number of eggs of mackerel and anchovy, Amphipoda and the larvae of *Euphausia* were found. The occurrence of the main species is shown in Fig. 2.

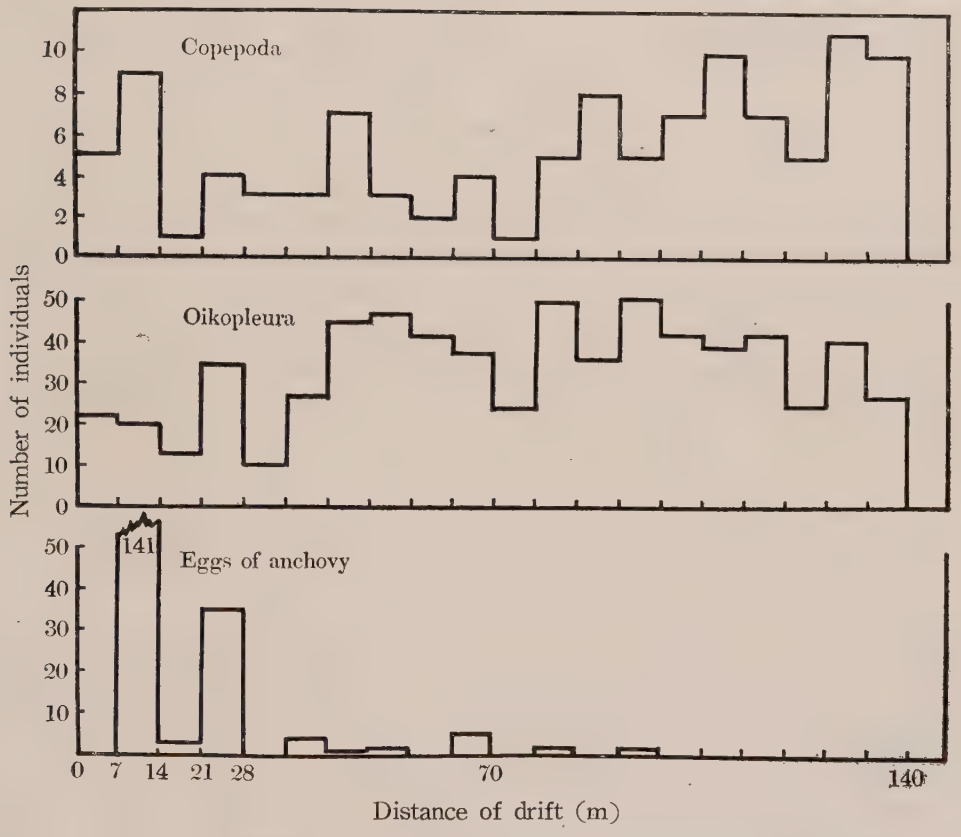


Fig. 2. The fluctuation of population density in each twenty liters of water taken with a continuous twenty pumpings on board a ship drifting along a straight line in the afternoon on June 28, 1955

The coefficient of variation of catches for *Oikopleura* (logarithmic values are used throughout these experiments, for the standard deviation is proportional to mean values of catches) is 34.1%, while that of Copepoda is 189 %. The value for eggs of anchovy is very high. Then the analysis of variance for *Oikopleura* and Copepoda is made as follows:

Table 7. Analysis of variance

Source of Variation	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square
Species (S)	1	6.9973	6.9973
Pumpings (P)	19	1.6559	0.0872
Residual (S × P)	19	0.7899	0.0416
Total	39	9.4431	

$F_o = V/\bar{X}$ = 4.3 for *Oikopleura*
1.7 for Copepoda
104.3 for Eggs of Anchovy

$F^{19}_{\infty}(0.05) = 1.59$

The mean square for pumping is slightly significant when tested against S × P. The percentage standard deviaton of a single observation is calculated as 79.4%. Furthermore, the divergence coefficient, $F_o = V/\bar{X}$, is calculated so as to ascertain the degrees of dispersion from the Poisson distribution, and is shown under the variance table. The values for each species are significantly higher than unity, especially high in the eggs of anchovy.

Series II

Twenty samples were taken beginning at 19:23 hours, in the evening twilight of the same day in the identical region with Series I. The ship was allowed to drift, and distance of collection of a sample (20 liters) was estimated to be 5.4 to 8.1 meters.

Many species (groups), *Oikopleura*, Copepoda, Amphipoda and calyptopis larvae of *Euphausia*, increased their number in the twilight migration (table 6). A small number of *Sagitta* and brachyuran zoea also appeared, which were not found in the daytime collection (Ser. I).

The catches of *Oikopleura*, Copepoda and eggs of mackerel are shown in Fig. 3. The coefficient of variation of a single observation for *Oikopleura* is 22.4%, and 21.7% for Copepoda; these are much smaller than those of Series I. The results of analysis of variance for the above two species and the divergence coefficient of main species are given as follows:

Table 8. Analysis of variance

Source of Variation	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square
Species (S)	1	0.0265	0.0265
Pumpings (P)	19	0.3371	0.0177
Residual (S × P)	19	0.7409	0.0390
Total	39	1.1045	

$F_o = V/\bar{X}$ = 17.1 for *Oikopleura*
8.3 for Copepoda
1.2 for Eggs of Mackerel

$F^{19}_{\infty}(0.05) = 1.59$

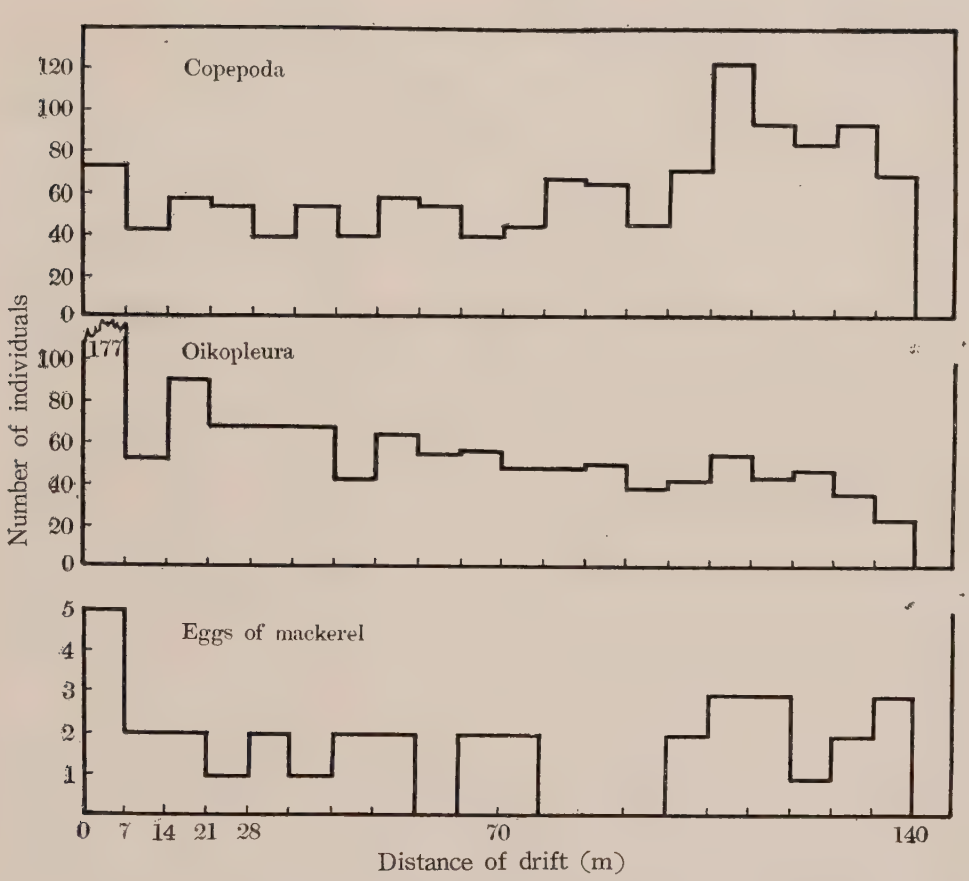


Fig. 3. The fluctuation of population density in each twenty liters of water taken with a continuous twenty pumpings on board a ship drifting along a straight line in the twilight on June 28, 1955

The mean square for pumping is not significant against S × P. The percentage standard deviation for a single observation is 47.4%. The divergence coefficients are significantly different from unity in both *Oikopleura* and Copepoda, while that for eggs of mackerel is not significant. It seems therefore that further examination is necessary for mackerel eggs owing to the low density of mean catches.

The two groups, *Oikopleura* and Copepoda which were abundantly collected, appeared in all samples, while such forms in low density as eggs of mackerel and anchovy, larvae of *Euphausia* and Amphipoda occurred very irregularly in the samples.

Motoda & Anraku (1955) have examined the variability of catches in replicate vertical plankton hauls, and found that the percentage standard deviations of a single observation vary from 30% to 250%. They suggested that the variability of catches in vertcal net hauls is largely due to a non-random distribution of the organisms rather than the technical matters. A similar order of variability has been reported by many workers.

The volume of water dipped by means of pump under a good condition, as in the present experiments, must be much more constant than the volume of water filtered by the net hauls. Accordingly the technical error in sampling the plankton from a certain volme of water may be much eliminated in the pumping method. Nevertheless, the variability of catches by pumping is not less than that of the net hauls, but also in the same order (about 50% or so). Thus the assumption may be held with reason that the variability of plankton collection is mainly due to some local variation in the distribution density of the plankton in a restricted area. Formerly, Barnes (1949) found the same order of variation in both pumping and net hauls and suggested that observed variability of net hauls is not entirely due to the variation in the volume of water filtered; the above assumption was confirmed by his further investigation (Barnes & Marshall, 1951),supporting the supposition of a 'contagious' distribution of plankton population.

The divergence coefficient ($F_o = V/\bar{X}$) is in all cases significantly larger than unity, indicating that individual plankton organisms are not distributed homogeneously in the restricted area but locally aggregated in some undetermined manner. The features of the distrbution of the organisms, of course, differ in each species, that is, the variance of *Oikopleura* differs considerably from those of Copepoda. On the other hand, the mean square for pumping calculated from the totals of both species is not significant. This insignificance is probably due to the counting of catches as a whole, without concern for separate species. A possible existence of the local swarming of each species is suggested strongly from Figs. 2 and 3. Such variability should not be considered as the variation of the residuals or inevitable errors.

A sample of the present experiments represents the mean catches for certain horizontal distance (5.4-8.1 m), but if the real volume occupied by swarming organisms is smaller than that of water tested in the present sampling, more detailed continuous sampling would be required to seek for fine features of distribution, and an extension of this type of work promises some future confirmation of conclusions in this paper.

The author wishes to express his appreciation to Prof. S. Motoda of the University for his kindness in giving helpful suggestions. He wishes to thank Mr. A. Iizuka, Technical Expert of the Hokkaido Regional Fisheries Research Laboratory, for giving

facilities and help for a part of this work. Thanks are also due to Mr. S. Nishizawa of the University for valuable suggestions on the statistical part of the paper. He is indebted to fellow staff members and the crews of the vessels, such as the training ship, Hokusei Maru of the University, the research ship, Tankai Maru of the Hokkaido Regional Fisheries Research Laboratory, and the fishing boat, Chofuku Maru, chartered by the above Laboratory, for their help in the work at sea. Financial aid granted from the Fisheries Agency, Ministry of Agriculture, for this study is gratefully acknowledged.

Summary

(1) The variability of catches caught by the two models of the Handy Underway Plankton Catchers was examined statistically by three series of experiments.

The percentage standard deviations of a single observation for the small catcher (Model I) are calculated as 55.6%, 163.5% and 57.1%, and those of the large catcher (Model II) are 78.6%, 85.2% and 57.3%. The order of deviations of both catchers is roughly the same, and the values are not greater than those previously reported for horizontal tows of Hardy Indicator or ordinary plankton net.

The mean ratios of catches of both catchers and three standard deviation limits of these values are obtained as 3.03 (1.30 - 7.08), 4.31 (1.73 - 10.72) and 2.73 (1.67 - 4.47); the ratio of the areas of openings in the head-piece between two catchers is 6.25. Thus, the amount of catch taken by the large catcher is not always proportional to that of the small one.

The difference of the proportion of each organisms caught with the two catchers over the tows indicates the differential selection of organisms with the type of machines.

(2) The twenty-minute horizontal tow with 130 cm stramin fish-larva net at low speed does not show a significantly different mean value of catches as compared with that of ten-minute tow with identical net. It is found that the approximate mean value of population of fish eggs and larvae is satisfactorily represented by the ten-minute tow. However, the percentage standard deviation of a single observation for catches in prolonged tow (20 min.) with such net is about one-half that of the short time tow (10 min.).

The twenty-minute tow usually can sample certain species that have not occurred in the ten-minute tow, but in some cases some of the species caught by the ten-minute tow are not found in the collection of the twenty-minute tow.

(3) A preliminary experiment on the horizontal distribution of plankton in a limited area was made by means of a hand pump method in which the amount of water sampled is accurately estimated. There was a certain extent of variability of catches similar to the case of net haul; this variability should involve other causes, more probably a non-random distribution of organisms themselves, rather than any technical error in the operation, which was well eliminated in the pumping method.

Literature cited

Barnes, H. (1949). On the volume measurement of water filtered by a plankton pump, with some observations on the distribution of planktonic animals. *Jour. Mar. Biol. Assoc.* **28** (3), 651–661.

———— (1951). A statistical study of the variability of catches obtained with two models of the Hardy Plankton Indicator. *Hull Bull. Mar. Ecol.* **2** (16), 283–293.

———— & Marshall, S. M. (1951). On the variability of replicate plankton samples and some applications of 'contagious' series to the statistical distribution of catches over restricted periods. *Jour. Mar. Biol. Assoc.* **30** (2), 233–263.

Hardy, A. C. (1944). Ecological investigations with Continuous Plankton Recorder: object, plan and methods. *Hull Bull. Mar. Ecol.* **1** (1), 1–42.

———— & Gunther, E. R. (1935). The plankton of the South Georgia whaling grounds and adjacent waters, 1926–7. *Disc. Rep.* **11**, 1–456.

Motoda, S. (1954). Handy Underway Plankton Catchers. *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.* **5** (2), 149–152.

———— & Anraku, M. (1955). The variability of catches in vertical plankton hauls. *Ibid.* **6** (2), 152–175.

Senta, T. (1955). [Eggs and larvae caught in the waters surrounding the Goto Islands in November and December, 1954.] *Investigation of Goto-nada and adjacent waters. Nagasaki Fish. Res. Inst.* **13** (71), 21–46. (in Japanese; Mimeogr. Rep.).

Winsor, C. P. & Clarke, G. L. (1940). A statistical study of variation in the catch of plankton nets. *Jour. Mar. Res.* **3** (1), 1–34.

MATHEMATICAL ANALYSIS OF THE FILTERING-RATE OF PLANKTON NET

Kiichiro KOBAYASHI and Shuzo IGARASHI

Faculty of Fisheries, Hokkaido University

Locating a cod type net, provided with extremely small sized mesh like a plankton net, in the running water, it is assumed that, owing to the so-called "Submerged Orifice" of the mesh, comparing to the current speed outside the net the one inside decreases; then the static pressure inside the net increases and the water current, having speed in proportion to the square root of the difference between the outside pressure and the inside one, passes through the mesh of the net.

As shown in Fig. 1, it is also assumed that the plankton net is made of only net excluding any other unit and that the sectional form of the net which is perpendicular to the current is circular.

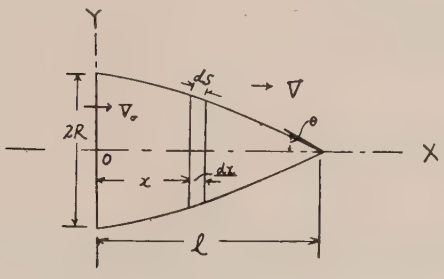


Fig. 1. Schematic figure of the plankton net

Now, the axis of reference and others are defined as follows:

X axis is on the plane containing the center of the section and is parallel to the current,

Y axis is perpendicular to X axis and is located at the entrance of the net,

V is the current speed,

V_o is the current speed at the entrance of the net,

V_x is the current speed at the section which is x distant from the origin,

2R is the diameter of the entrance of the net,

l is the length of the net measured along the center line.

Generally the current speed has various values at any point on X axis. An expression $y=f(x)$ may be expressive of the form of the net, so that if the current speed at any section be distributed equally, the amount of the water flowing into x-section is

$$\pi f(x)^2 V_x \qquad \cdots\cdots(1)$$

Similarly, the amount of the water flowing out of x+dx section is

$$(V_x-dV_x)\{f(x)-df(x)\}^2\pi \qquad \cdots\cdots(2)$$

Then, it is assumed that the amount of the difference beween (1) and (2) flows out through the mesh of ds width.

As the current speed passing through "Orifice" is proportional to the square root of pressure difference, the amount of water passed through the "Orifice" is expressed by $c\alpha 2f(x)\pi ds\sqrt{2g(p_x-p)}$; by using Bernoulli's theorem $V^2-V_x^2=2g(p_x-p)$, then one gets

$$c\alpha 2f(x)\pi ds\sqrt{V^2-V_x^2} \qquad \cdots\cdots(3)$$

Here, it is assumed that the pressure outside the net is constant. In (3), c is Vena Contracta, α is the ratio of the area of the mesh to the total area of the net.

Accordingly, one gets

$$f(x)dV_x+2V_x f'(x)dx=c\alpha\ 2ds\sqrt{V^2-V_x^2}$$
$$=2c\alpha\sqrt{1+f'(x)^2}\sqrt{V^2-V_x^2}\ dx$$

Substituting $V\sin\varphi$ for V_x in the above expression, one obtains

$$f(x)V\cos\varphi\ d\varphi+2V\sin\varphi f'(x)dx=2c\alpha\sqrt{1+f'(x)^2}\ V\cos\varphi\ dx$$

$$\therefore \frac{d\varphi}{dx}=\frac{2\{c\alpha\sqrt{1+f'(x)^2}-\tan\varphi f'(x)\}}{f(x)} \quad \cdots\cdots(4)$$

$$\therefore\ \varphi\ =\int\frac{2\{c\alpha\sqrt{1+f'(x)^2}-\tan\varphi f'(x)\}}{f(x)}dx+\text{const.} \quad \cdots\cdots(5)$$

Constant of integration is

$$V_x=V_0=V\sin\varphi_0 \qquad \text{at } x=0$$

and V_0 must be determined by the following expression,

$$\pi R^2V_0=\int_0^l 2\pi y\ ds c\alpha\sqrt{V^2-V_x^2}$$
$$=\int_0^l 2\pi f(x)\sqrt{1+f'(x)^2}\ c\alpha\sqrt{V^2-V_x^2}\ dx$$
$$\therefore \sin\varphi_0 R^2=2\int_0^l c\alpha\ \cos\varphi\ f(x)\sqrt{1+f'(x)^2}\ dx \quad \cdots\cdots(6)$$

Solve both (5) and (6), and it will be possible to decide the distribution of the current speed inside the net on various points on X axis and current speed at the entrance of the net V_0.

Now, let K be the ratio of the current speed at the entrance of the net to the one outside the net, one gets

$$K=\frac{V_0}{V}=\sin\varphi_0 \quad \cdots\cdots(7)$$

But it is not easy to solve (5) and (6).

As the plankton net generally used is of a rectangular conical type, one gets

$$y=\tan\theta(l-x)$$
$$R=l\tan\theta$$

Substituting these expressions for the references in (5) and (6), it follows that

$$\frac{d\varphi}{dx}=\frac{2(c\alpha\sec\vartheta-\tan\varphi\tan\theta)}{\tan\theta(l-x)}=\frac{2(\frac{c\alpha}{\sin\theta}-\tan\varphi)}{l-x}$$
$$\sin\varphi_0=\frac{2c\alpha}{l\sin\theta}\int_0^l\cos\varphi(1-\frac{x}{l})dx$$

and substituting μ and t for $\frac{c\alpha}{\sin\vartheta}$ and $\frac{x}{l}$ respectively in the above expressions, one gets

$$\frac{d\varphi}{dx}=\frac{2(\mu-\tan\varphi)}{l-x} \quad \cdots\cdots(8)$$

$$\sin\varphi_0 = 2\mu\int_0^1 \cos\varphi(1-t)dt \qquad \cdots\cdots(9)$$

Integrate (8), and it follows that

$$\frac{1}{\left(1-\frac{x}{l}\right)^{2(1+\mu^2)}} = \left|\frac{\cos(\varphi_0+\delta)}{\cos(\varphi+\delta)}\right| l^{\mu(\varphi-\varphi_0)} \qquad \cdots\cdots(10)$$

Where δ is nominated from the next expression, $\tan\delta = \frac{1}{\mu}$.

In order to get the value of φ_0 which satisfy (9) and (10), give various values to φ_0 of (10) for the special value of μ, find the relation between φ and $\frac{x}{l}$, put it into the right term of (9) and calculate definite integrals. And thus, among these definite integrals, it becomes possible to find the satisfactory value which coincides with the left term of the expression (9), ($\sin\varphi_0$).

After a number of such calculations, one should get the following result, "The current speed inside the plankton net is constant and its value is $\tan\varphi_0=\mu$".

In conclusion, the next formula is obtained concerning the filtering-rate,

$$\sin\varphi_0 = \frac{\mu}{\sqrt{1+\mu^2}} \qquad \cdots\cdots(11)$$

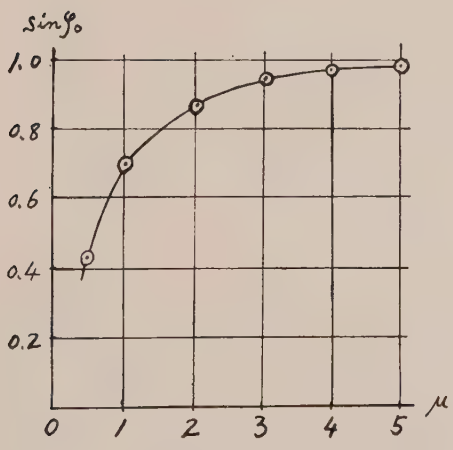


Fig. 2. The relation between $\sin\varphi_0$ and μ, which is calculated by the formula (11)

Fig. (2) gives the relation between the filtering-rate of the plankton net and μ.

The writers are very grateful to Mr. Okawa, Mr. Anraku and Mr. Nishizawa for their kind directions.

Resume

1. Towing a conical type net in water, having extremely small sized mesh like the plankton net, the relative current speed inside the net may be smaller than the one outside the net.

2. Towing the rectangular conical type plankton net in water, the current speed inside the net is constant. Let the filtering-rate be the ratio of the current speed inside the net to the one outside; it can be expressed by the formula (11).

References

1) Enomoto, Y. (1955). Some experiments on the filtering-rate and the resistance of plankton net in the water tank. *Bull. Seikai. Reg. Fish. Lab.* (6), 3-10 (in Japanese with English abstract).

2) Fujimoto, B. (1953). *Ryutai no Rikigaku to Ryutaikikai.* 352P. Tokyo; Yokendo.

3) Nishizawa, S. & Anraku, M. (1956). A note on measuring of the volume of water filtered by plankton net by means of a flow meter. ***Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.*** 6 (4), 298–309. (in Japanese with English abstract).

4) Tanaka, S. (1955). Estimation of the abundance of the eggs of fish such as sardine–I. ***Bull. Jap. Soc. Scien. Fish.*** **21** (6), 383. (in Japanese with English abstract).

中層トロールに関する研究

Ⅳ その機構と実地試験について

小林喜一郎
(北海道大学水産学部水産機械学教室)

An Experiment on a Mid-Water Trawl

IV. On its mechanism and a trial practice

Kiichiro KOBAYASHI

Abstract

The author designed an experimental full scale model of a mid-water trawl and made a study on its dynamical stability and utility. The special features of this mid-water trawl are that it is fitted with two otter boards as light in weight as possible, a depressor for sinking the trawl net to any depth of sea water just as one wishes, and a depth indicator which indicates the depth of the position of this net from the surface of sea water.

Mathematical calculations were made beforehand on the relations between the depth and the towing velocity, the fluid resistance and the towing velocity. Therefore, based on the data obtained from the above calculation, the utility of this fishing gear was tested in Hakodate Bay. The theoretical values were found to coincide fairly well with the results of this test.

It is proved that this gear has a good stability, the net form is good, and the depressor and the otter boards are considerably effective.

Ⅰ まえがき

さきに筆者[1]は，オッタートロールの形式をとつた中層トロールについて，ワープの長さと網の深さ，及びワープの長さと網口の開き，等の関係について理論的な考察を加えた。その後デプレッサー(Depressor)を備えたビーム式中層稚魚トロール網[2]を試作し，噴火湾に於て実地試験を行つた。昭和30年度に於ては，中層トロールの研究について水産庁より応用研究費が与えられたので，更に中層トロールに関する基礎的な研究を実施する一方実物模型網を試作し，本学部及び北海道水産試験場の協力のもとに，函館沖に於て実地試験を行つた。尚その結果を基にして第二次実物網の設計を完了した。こゝにその経過を報告する。

Ⅱ 予備的考察

底層魚を漁獲対象とした底曳網漁法は，これにオッターボードをつける事によつてトロール漁法[3]となり飛躍的な発展を遂げたのであるが，今日に於ては底層魚のみならず中層や表層を游泳するニシン，アジ，サバ，等を漁獲対象として，海中任意の深度を曳網し得るような所謂中層トロール漁法が要求されるようになつた。中層トロールは非常に広範囲な漁場と魚族とを対象とし且機動性をもつているという点に於て劃期的な漁法というべきであるが，我国に於ては，二三の模型網[4]による実験と，試験的な中層稚魚トロール[2]及び昭和29年に北海道水産試験場が実施した角錐形網＊による中層トロールの試験があるのみで未だ実用の段

＊ 大垣光平・福原晥 (1954). 中層曳網の実験 (未発表)

階に到つていない。欧米に於ては已にニシンを対象とした中層トロール（Mid-Water Trawl）[5] が実際に使用され，又魚類生態を研究するための深海層トロール[6]（IKMT）かスクリプス研究所で実験に供されている。その他文献[7][8]にも種々のタイプの中層トロールが実験や実用に供されている報告が見られる。魚群探知機の発達と共に中層魚群の発見が容易となり，中層トロールは一歩前進した観があるが，中層トロール漁法に要求される種々の条件が，網の力学的な不安定性や機構学的な困難性から，すべてか完全に解決されているとは思われない。従つて前記欧米各国の中層トロールが必ずしも理想的な中層トロールであるとは考えられないが，ニシン漁業に対して新しい技術を開拓したものとして注目してよい。然らば理想的な中層トロールに要求される種々な条件とは何か，又それらは如何なる方法によつて解決されればよいか等について考察を加えてみよう。

（1）魚探によつて発見された魚群の游泳深度に，適当な速度を以つて網を曳かなければならない。

トロールのような運用漁具を水中で曳行すると，その水中抵抗のために網が浮上り，曳網速度をおとすと網は沈下し，一定の深度を種々な速度で曳網する事は容易でない。そこで所望の深度に網を曳こうと思えば先ず曳綱の長さと，曳網速度とを共に加減する方法が考えられる。しかし実際に於てはワープの長さと，曳網の速度とを同時に調節する事は中々困難であり，又予備実験によつてそれ等の間の関係を予め知つておかねばならない。ワープの角度から網の深度を知る事が出来る[9] と報じているものもあるが，実際には極めて不正確であつて実用になるとは思われない。又別に網に深度計* をつけておけば，網の深度を続みながらワープの長さなり，曳網の速度なりを加減すればよいわけであるが，深度計の導線の処置に一考を要する。ワープの中に[10]導線を封入する事も考えられるが非常に高価なものになる。その他の方法としてはデプレッサー[6]**によつて網を沈める式のものがある。現在多く使われているのが此の方法で，曳網の速度を増すと沈降力も増加するような翼型の抵抗板をとりつけ，漁具に適当な沈降力を持たせておいて，あとはワープの長さで深度を調節するのである。この場合デプレッサーの沈降力を船上で加減出来るようにしておいて，網に深度計をつけ，これをみながら深度を調節出来れば非常に便利であるが，さてこのようなデプレッサーの構造や寸法をもとめるとなると又容易なことではない。

（2）底曳網の場合には魚の逃げる方向は網の上方のみであるが，中層トロールでは魚群の機動性と相まつて，網の上下両方向に逃げるので，特に網口を大にし，且網成りを良好に保持せねばならない。

中層魚は底層魚に比して游泳速度が大きく且機敏であるから底曳網よりも大きい網口を必要とするであろう。網口を大きくする方法としては単に硝子球や鉛沈子を数多くつけただけではその抵抗が増し，網口を後方に引張り，反つて網口を狭めるから，抵抗に比して揚力の大きいカイト（Kite）[11] やパラベーン*** (Paravane) の如きもの，或はハットフロート **** (Hat-Float) と称せられる特殊の浮子を使用するとか，鉛沈子の代りにはデプレッサーの効果的な利用等が考えられる。

（3）底曳網やトロール網では，オッターボードやワープが海底を辷つて砂泥をまきあげ[12]，魚群に対する威嚇と遮断作用を生じ甚だ効果的であるといわれているが，中層トロールには此の作用がない。

もつともこの問題については異説[13]があつて，中層魚に対してはこのような威嚇作用は反つて魚群を網口から遠ざけるから，むしろオッターボードなどは手網から左右に遠く離してつけるべきであるという説である。この点については尚研究を進めて解決せねばならないか，積極的に魚群を網口に誘導しようと思えば，例えば集魚灯の効果的な応用，或は最近注目されている電載漁法[13]などを利用することが考えられる。

* 井上直一・福田雅明（1955）．深度計の試作（未発表）

** California cooperative sardine research program. Progress report (1950). Calif. Acad. Sci., Calif. Division of Fish & Game, S. I. O., & U. S. Fish. & Wildlife Service.

*** 木村嘉次訳（1952）．英国大型トロール船フェアリー号について，漁船（60），36－40.

**** Patent deep sea trawl plane which provides greater power. The Fishing News 37(1912), 16—17. 1949.

(4) 魚群と漁船に対して適当な網の構造と大きさを有し，取扱いが簡単で機能確実，且製作費が低廉であることが望ましい。

これはすべての漁具についていわれる事であるが，中層トロールは特に網口を大きくしなければならないので，それに伴って沈子，浮子やオッタボードが大型となり，漁具の操縦に大きな動力を要する事になる。従って漁船の大型化，ひいては大きな資本を必要とするから，中層トロールの普及が困難になる。これらの点を考慮して，小型でしかも漁獲能率のよい構造である事が望ましい。

Ⅲ　実物模型の構造と諸元

こゝで我々は一つの実験を試みた。以上の諸条件を出来るだけ満足せしめるような中層トロールの一機構を想定し，その実物模型を作り，オッターボードやデプレッサー等の個々の部品については，室内に於ける水槽実験* によってその性能を確かめつゝ，このような機構の中層トロールが実用性があるかどうか，漁具の力学的特性はどうか，というような点について理論的な考察と実地試験とによって研究した。但個々の部品例えばオッターボードとデプレッサーの大きさ，或は網とデプレッサーの大きさとは必ずしもマッチしていない。これは網に比してその他の部品のキャパシテイに余裕を持たせたからで，これは実験の途上に於てしばしば用いられる方法であり，機構上の検討には差支えないと考えたからである。以下実験に用いた漁具の構造，機能等についてのべる。

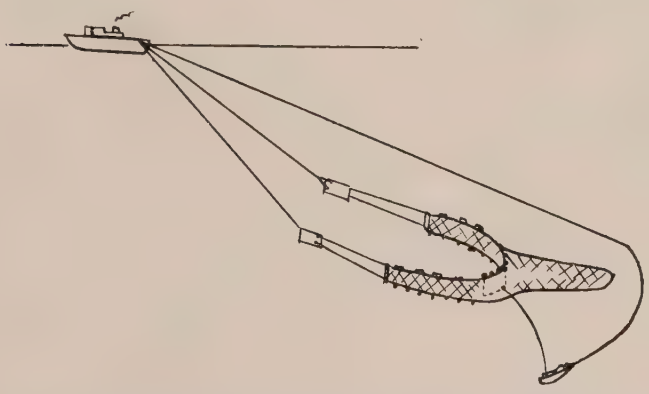


Fig. 1. The mid-water trawl shown in fishing position

(1) 全体構造

全体構造は Fig. 1 に示すごとくトロール網と略同様であるが，オッターボードは重量を軽減し，上縁に木材，下縁に鋼板をあてて中層に於ける安定を良好にした。その他に網口の下際に 7.5 m のロープにて鋼板製のデプレッサーを吊下げ，尚デプレッサーの後端から船上まで別に操作綱をとり，このロープを引張る事によりデプレッサーの俯角を変えて沈降力を調節し，これによって網の深度を調節し得る如くした。更に綱の下際には深度計をとりつけ，キヤプタイヤコードをワープに沿わせて船上に導き網の位置を直読出来るようにした。

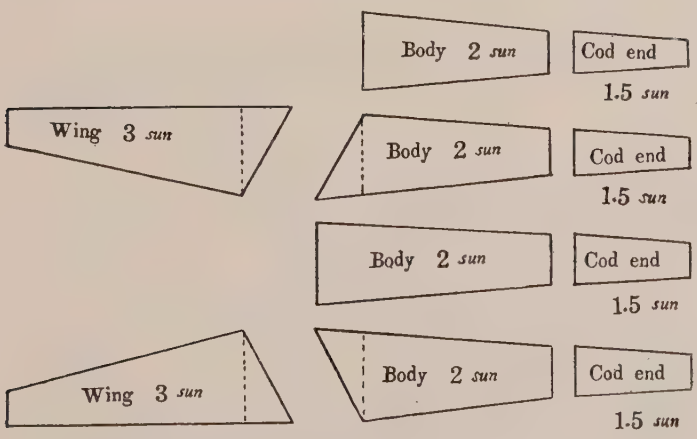


Fig. 2. Construction of the net

* 小林喜一郎・大川鉄男・五十嵐脩蔵 (1955). 環流水槽の試作。日本水産学会北海道支部大会講演

(2) 網　綿糸を材料とした Fig. 2 に示すような構造である。浮子と沈子については適当なものが確認出来ないので，とりあえず浮子については紡垂形の合成浮子10個，4寸硝子球7個で，水中浮力は略5.6kg，沈子は60匁鉛34個，水中沈力は略6.8kgを使用した。尚網全体の水中重量は約4.5kgである。

(3) オッターボード　Fig. 3 に示すような鋼棒熔接の翼型骨組にキヤンバスを張つたもので，上縁には木製の浮子，下縁には鋼板の沈子をつけて上下の安定をよくすると共に，ブライドルチエーンは4本とし，流れとなす角は約40°となるよう取付けた。尚オッターボードの水中重量は約18kgである。

(4) デプレッサー　Fig. 4 に示す如き2mm鋼板熔接の翼型抵抗板で，水平投影面積は0.35m²，水中重量は17kgである。デプレッサーの吊綱は1本で前縁より約1/3の点を支えている。又垂直安定板の後端には別にデプレッサーの俯角を調整するための操作綱をとりつけ，船上にて之を引けば，デプレッサーの俯角が増して揚力が減じ，網を浮上せしめる如くした。

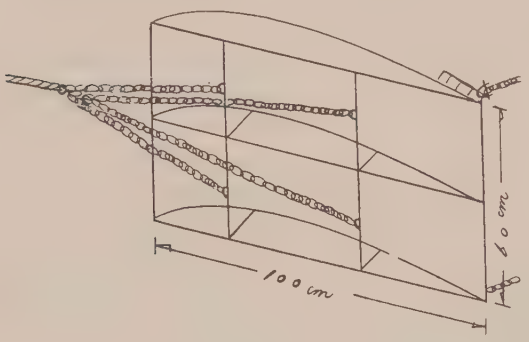


Fig. 3. The otter board

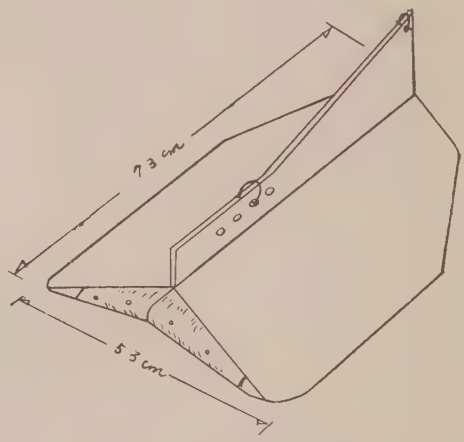


Fig. 4. The depressor

(5) 深度計　Fig. 5 に示す如くスプリングの入つたベローズに水圧をうけ，その縮みをラックピニオンを通してレオスタットの値を変化せしめるようにした電気深度計で，深度は電流で示されるから，予め室内の水圧タンクにその受圧部を入れキヤリブレートした。

(6) ワープ　ワープは7分のロープで片側100mずつを用意した。その水量重量は0.058kg/mである。

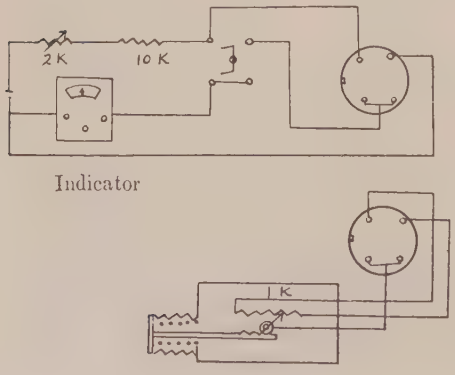
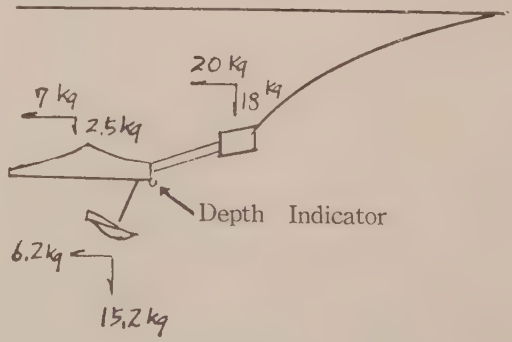


Fig. 5. Circuit of the depth indicator



Fig; 6. Schematic figure of the trawl net

IV 理論的考察

このような中層トロール網について，次の4項について予め理論的考察を行つた。

(1) ワープの長さ40mでデプレッサーを装着した場合の船速と網の深度，及びデプレッサー無き場合の船速と網の深度

(2) ワープの長さ50mで (1) と同様の事項及びワープにかゝる張力

(3) ワープの長さ50mでこのデプレッサーを2台装着した場合の船速と網の深度

(4) 水中に網を静止した時にこの漁具の水中重量が殆んど零となるような場合を考え，水平投影面積が，0.5m² で且揚抗比2なる如き翼型のデプレッサーを2台装着し，ワープの長さ50mの時の船速と網の深度

計算の概略は次の通りである。即ち網とデプレッサーに働く力を水平方向と垂直方向とに分け，各々の分力和が手綱を通してオッターボードに働くものと考え更にオッターボードの水中重量と，抵抗の流れの方向の分力とが前記の二分力に加算され，これらの合成力がワープの下端に働くものと考える。合力の大きさと其の方向が定まり且ワープの長さが与えられれば，ワープの重量がその水中抵抗に比して大なる時は小林[13]の式を，小なる時は川上の式[14]を用いて，ワープの下端までの深度が計算出来る。網口の下際即ち深度計取付位置の深さはこれにオッターボードから深度計取付位置までの鉛直深さを加えればよい。網の抵抗値については川上[15]及び田内の式[16]を，オッターボードの抵抗については Duchemin の式[17]を，又デプレッサーの抵抗と沈降力については実験値を使用した。ワープにかゝる張力については，網，オッターボード，デプレッサー等にかゝる抵抗値を加えた値とした。速度が変る場合の抵抗値の変化はすべて速度の2乗に比例するものとして計算した。但ワープは速度が増すと流れとなす角が変るので，その抵抗値の変化は川上の式[14]によつて求めた。

1例として速度 1m/sec，ワープ長50mの場合の網の深度とワープ張力の求め方を示す。

イ) 網の抵抗値の計算

袖網については川上及び田内の平面網に関する式を用いる。平面網地が流れとなす角が θ である時，その単位面積当りの抵抗 K_θ は

$$K_\theta = K(1-\cos^2\varphi\cos^2\theta)$$

Kは単位面積の平面網地が流れに垂直に支えられている時流れの方向に働く抵抗で

$$K = \frac{C_0}{2}\rho v^2\frac{D}{L}\sec\varphi\cos\varphi$$

で与えられる。こゝに C_0：網糸の抵抗係数≒1，ρ：流体の密度$=\frac{1}{980}$，D：網糸の直径＝0.1cm，L：脚の長さ＝4.5cm，2φ：2脚のなす角＝60°

数値をあてはめて計算すると

$$K = \frac{1}{2}\times\frac{1}{980}\times100^2\times\frac{0.1}{4.5}\times2.3 = 0.23^g/cm^2$$

袖網が流れとなす角は20° より30° の間と推測されるので

$$K_\theta = 0.23\times(1-0.866^2\times0.9063^2) = 0.0874^g/cm^2$$

袖網の面積は 52440cm² であるから片側の袖網にかゝる抵抗は

$$0.0874\times52440 = 4.6kg$$

次に嚢網については楔形嚢網に関する川上，谷口の式[18]により抵抗Rは

$$R = 2K\{(1-\cos^2\varphi\cos^2\theta)B_1 + (1-\cos^2\varphi)B_2\}$$

こゝに B_1，B_2 はそれぞれ嚢網の上下面及び両側面の面積，2θ は楔形の角度である。数値を入れて計算すると　$R=2\times0.23\times\{(1-0.866^2\times0.766^2)\times4.86+(1-0.866^2)\times4.95\}\times10^4 \fallingdotseq 9kg$

従つて流速 1m/sec に於ける網の抵抗は略 14kg と計算した。水中重量は 4.5kg であるから，片側の手綱にかゝる力は各々その半分で，水平方向の抵抗は7kg，水中重量は約2.5kgとなる。

ロ） オッターボードの抵抗

オッターボードが流れの方向となす角をθとすれば，板面と略直角をなす方向に働く力Pは，面積をSm^2として，$1m^2$の板面が流れに垂直にある時の抵抗値を$P_\perp$で表わし

$$P = P_\perp \frac{2\sin\theta}{1+\sin^2\theta} S, \qquad P_\perp = C\frac{\rho v^2}{2}$$

但Cは抵抗係数＝1.1，数値を入れて計算すれば，$\theta \fallingdotseq 40°$であるから

$$P = 1.1 \times 51 \times \frac{1.286}{1.41} \times 0.6 = 31kg$$

従つて流れの方向の分力は 31kg × cos 50° ＝ 20kg，水中重量は 18kg である。

ハ） デプッサーの沈降力と抵抗

デプレッサーについては俯角の設定が困難であつたので，船による実測値を用いた。即ち 1.8m/sec の速度に於ける吊綱の張力が75kg，水平となす角度が56°である。従つてこの力を水平方向と垂直方向の力に分解し，その中の垂直分力より水中重量を差引き，残りの分力を流速1m/secに換算すると，水平分力12.4kg，垂直分力 13.4kg となつた。デプレッサーは1個であるから左右両袖にその½ずつの力がかゝるとして，水平分力 6.2kg，垂直分力6.7kg となる。これにデプレッサーの水中重量の½を垂直分力に加えて 15.2kgが垂直分力である。

ニ） ワープの抵抗

7分のロープの直径を cm に換算すると 2.2cm，このロープが流れに直角にある時の抵抗は，抵抗係数を1.4として $1.4\times0.022\times51\fallingdotseq1.64^{kg}/_m$，水中重量と抵抗との比は $^{0.058}/_{1.64} = 0.0354$

Fig. 6 に示す如くワープの下端に於て水平方向に（6.2＋7＋20）kg，垂直方向に（15.2＋2.5＋18）kg なる力がかゝるからこれを合成してその値と方向とを求めると，48.8kg，水平方向となす角が47° となる。ワープ長50mでかゝる場合の下端の位置の深さを求めればよい。ニ）によりワープの抵抗はその水中重量に比してはるかに大きいから，川上の式とその数表を用いて計算する。即ち Table 4 より47° に於ける τ ＝ 1.01837 を求め，これにて合力 48.8kg を除して

$$T_0 = 48.8 \div 1.0837 = 48$$

同表の（25）式に入れて $\frac{48}{1.64}\times(\sigma-\sigma_0)=50$， とおき$\sigma$を求める。

47° に於ける $\sigma_0 = 0.93733$ を代入して，$\sigma = 2.64$ このσに対応するワープの水平交角は $\theta = 21°40'$ 従つてワープ下端の深度hは $h = \frac{48}{1.64}\times(1.70-0.8367) = 25m$

次に網の下際までの深さは，このhの値にオッターボードの後端から深度計の取付位置までの鉛直高さを加えねばならない。そのためには手網が水平方向となす角を求める必要がある。デプレッサーと網の各分力は，水平方向に 13.2kg，垂直方向に 17.7kg であるから角度 θ は

$\theta = 53°20'$ 従つて $\sin\theta = 0.8039$

深度計までのきよりは 6.2m 従つて求むる鉛直高さは $6.2\times0.8039 = 5.0m$ よつて水面から網の下縁までの深さは，船速 1m/sec，ワープ長50mの時30mとなる。

次にワープの張力を求めるためには次の如き計算によつた。この計算は非常に粗雑なものではあるが大体の値は分る。即ち網とデプレッサーにかゝる合力は 22kg，オッターボードにかゝる抗抵は 31kg，水中重量は 18kgであるからその合力は 36kg，この二力の方向は70° 以上の開きがあるが簡単のためその和をとり58kg，次にワープの抵抗は，上端と下端の水平方向となす角度の平均をとつて $\frac{1}{2}\{21°40'+47°\}=34°20'$，ロープにかゝる抵抗はその流れとなす角の sine に比例すると考えて $1.64\times50\times\sin34°20' = 46kg$，従つてワープにかゝる張力は 58 ＋ 46 ＝ 104kg である。

以上の如き計算を速度 1.0，1.2，1.4，1.6，1.8，2.0 m/sec について繰返えした結果を第1表に示す。

Table 1. Relations beween the depth of the net in water and the towing velocity, the tension of the warp and the towing velocity (calculated values)

Towing velocity ($^m/_{sec}$)	Depth of the position of the net in water (m)						Tension of the warp (Kg.)
	Warp length 40m, without depressor	Warp length 40m, with 1 depressor	Warp length 50m, without depressor	Warp length 50m, with 1 depressor	Warp length 50m, with 2 depressors	Warp length 50m, with 2 special depressors	Warp length 50m, with 1 depressor
1.0	19.6	27.5	22.1	30.0	36.0	24.8	104
1.2	15.5	22.9	17.3	25.4	31.1	〃	132
1.4	11.8	19.7	14.3	22.6	27.3	〃	166
1.6	8.9	17.4	11.6	20.0	26.1	〃	204
1.8	6.7	16.1	9.7	18.8	23.6	〃	246
2.0	5.5	15.0	8.5	17.6	22.1	〃	281

V 海 上 実 験

海上実験には北海道水産試験場所属船大雪丸 32.75噸 を使用した。投網の順序は次の通りである。即ち船を徴速にして運航しつゝ舷より先づデプレッサーをおろし，続いて網の嚢部，次に胴，袖網，最後にオッターボードをおろすと共に船速をあげ，オッターの開度充分ならば，船を所望の速度にて運航する。途中船をとめると漁具は自重により沈降して網とオッターボードが纏絡する事がある。実験はデプレッサーのみの機能試験，漁具を完成して，ワープ長さ50，40，20，mの時に，船速（投下物体により測定），深度計により網の位置，ロープ張力計[19]によるワープの張力，アングルデッカーによるワープの角度等を測定した。又その途中デプレッサーの操作綱を引張つた時の網の深度の変化等を測定した。折柄11月上旬で海上は時化多く充分な実験を行つていないが，得られた結果について理論値との比較，機構上の検討等を行つた。実験結果を第2表に示し，此れをグラフに画いて理論値と共に Fig. 7 に示した。

Table 2. The results of the test

Warp length (m)	20	20	20	40	40	20	20	20	40	40	40	40	40	50	50	50	50
Depressor		pull				pull					pull a little	pull					
Depth indicator (m)	14	7	11	17.5	15.5	6.5	11	10.5	16.5	19.5	15	12	19	22	21.5	20.5	19.5
Angle of warp (°)						65	65	63	65	64				65	65	65	70
Tension of warp (kg.)						70	100	125	255	150	150	45	145	145	175	220	255
Towing velocity ($^m/_{sec}$)	1.0	1.0		0.84	1.25		1.61	1.88	1.74	1.48	1.48	1.48	1.48	0.99	1.32	1.66	1.82

VI 実験結果の検討

1) 理論値にみられる如くこのトロール網は船速の増加につれて次第に浮上する。実験に於てもこの傾向が見られる。船速によつて浮上しないような網にするためには，直線⑥に示された如く，漁具の水中重量が殆んど零であるような構造にしなければならない。

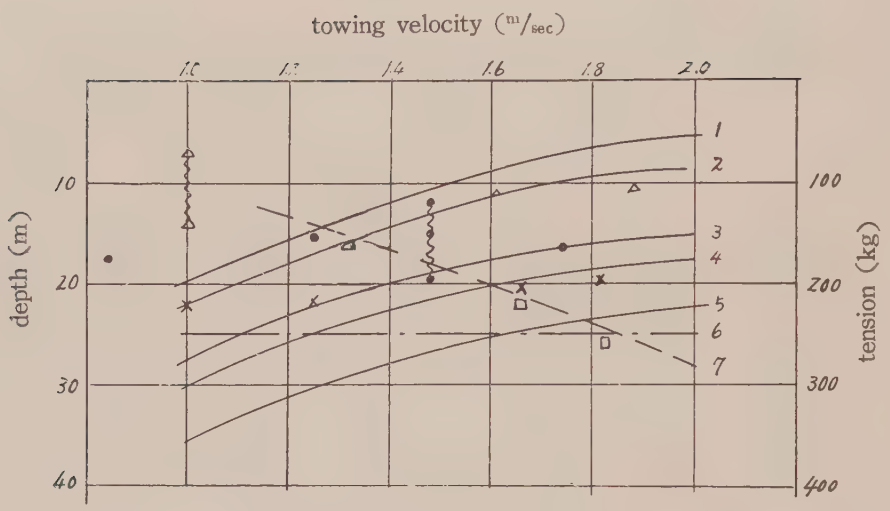


Fig. 7. Relations between the depth of the net in water and the towing velocity, the tension of the warp and the towing velocity

Calculated values

1. Warp length 40m without depressor
2. Warp length 50m without depressor
3. Warp length 40m with one depressor
4. Warp length 50m with one depressor
5. Warp length 50m with two depressors
6. Warp length 50m with two special depressors
7. Warp tension (Warp length 50m with one depressor)

Tested values

Mark (△); Warp length 20m with one depressor. when the towing velocity is 1m/sec, the net is risen up by drawing the rope of the depressor

Mark (・); Warp length 40m with one depressor. When the towing velocity is 1,48 m/sec, the net is risen up by drawing the rope of the depressor

Mark (×); Warp length 50m with one depressor

Mark (□); Warp tension (Warp length 50m with one depressor)

2) 張力は船速の増加に対し1乗に近い増え方をするが，これはワープの抵抗が大きい部分を占めているからで，網が大型になつてその抵抗が大きくなると異つた結果が出よう。

3) デプレッサーの操作綱を引張つてその俯角を変えると網は浮上し，デプレッサーが引くり返つて沈降力が零の状態では，ワープ長40mで1.5m/secの船速で約7.5mの浮上があり，略理論値と合致し，デプレッサーによる網の沈降は有効である事が分る。たゞこのデプレッサーの操作綱が長くなつて60mを越すと，それ自体の抵抗が非常に大きくなり，人力では操作が出来なくなる。従つて機械力を必要をするであらう。

4) デプレッサーを網口の下際につけたために，網口はよく開いた。

5) オッターボートは安定良好で袖網の展開は充分であつた。

6) 深度計を見ながらワープの長さを変化せしめて深度の調整は出来るが，ワープをのばしている間に網

は沈むから，深度の調整に時間を要す。速度が変つても深度の変らぬ漁具が望ましい。

7) 網の深度が変つても，ワープの水平交角はあまり変らない。従つてワープの角度から網の深度を求める事は，角度測定の不正確もさる事ながら，事実上不可能に近い。

Ⅶ あ と が き

我々はこれらの実験結果を参考にして第2次の中層トロール網を設計した。これは水中重量を略零にするような漁具で，これによつてワープをのばしている間にも深度が変らぬようにした。デプレッサーは2個とし，手木前方につける。そして深度計をみながらワープの長さで網の深度を調整する式のものであるが，別にデプレッサーに操作網をつけて，前回同様その俯角を変える試験も併せて行う予定である。大体構造は，Fig. 8に示した。網の材料にはアミランを用いて出来るだけ抵抗を少くし，又網口を開くために大幅の前網

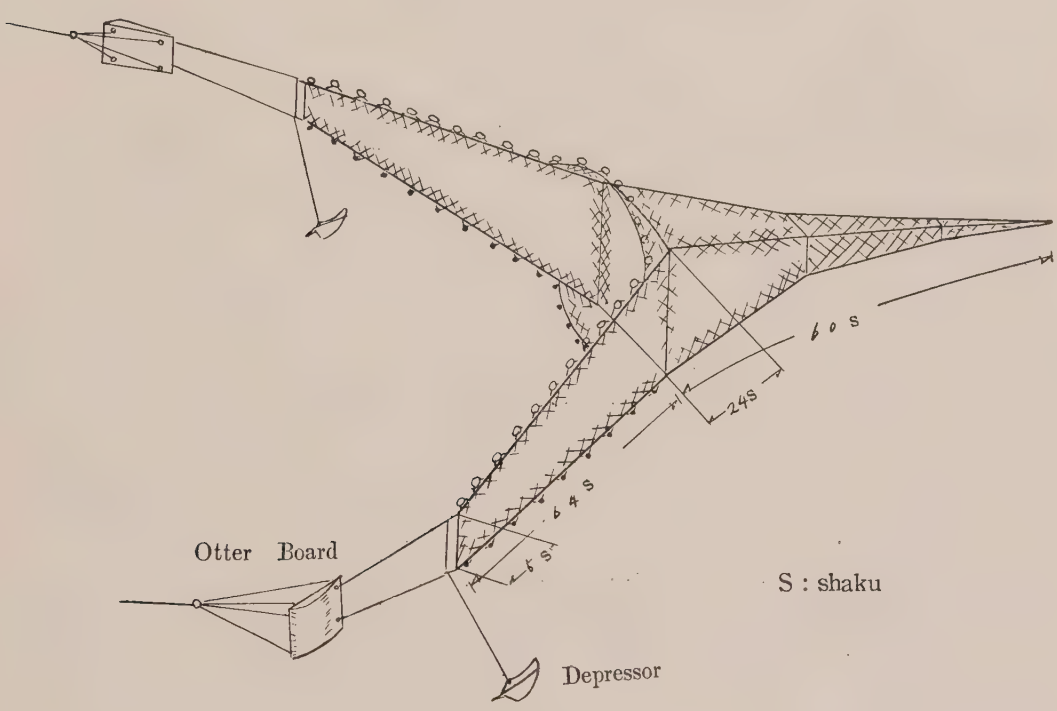


Fig. 8. The construction of the net new designed

及び小舌網をつけ，夫々特殊の展開装置をつけて網口の拡大をはかる。オッターボードは第1次の場合と構造は同様であるが面積を増し，且重量を更に軽減して，水中重量を略零にする。デプレッサーは木製翼型とし，揚抗比を2以上にする。此の設計によれば，船速にかかわらず網はデプレッサーの容量に応じて一定の深度を保ち，船速零の場合でも沈むことはないから，ワープの長さを加減する事により容易に所望の深度に保持する事が出来る。

第2次網は3月末の鰊漁業に之を試みる予定である。

本研究は昭和30年度に中層トロールに関する研究なる題目のもとに，北海道水産試験場と，本学部の協同研究に対し，水産庁の応用研究費を仰いで実施したもので，主任研究員井上直一教授外14名の協力者の大き

な努力を要した。特に網の製作については本学部川崎教授，深度計については井上教授，実験に際しては斎藤教授及び水産試験場大垣場長外同場の各位に負うところ大である。こゝに紙上をかりて深甚の謝意を表わします。

文　　献

1) 小林喜一郎・高橋広弥（1951 a）. 中層トロールに関する一考察. 北大水産彙報 **1**（3.4），139–141.
———— • ————（1651 b）. 中層トロールに関する一考察（続報）. 同誌 **2**（1），86–89.
2) ———— • 出口豊吉（1952）. ビーム式中層稚魚トロールの一実験. 同誌 **3**（1），104–108.
3) 斎藤市郎（1949）. トロール漁業. 352p. 東京；丸善.
4) 高山重嶺・小山武夫（1953～4）. 中層曳網の研究. 水産研究所年報.
小倉通男（1954）. 中層曳網模型実験. 日水誌 **20**（4），259–262.
5) Barraclough, W. F.（1955）. New mid-water trawl developed in British Columbia. *Canadian Fisherman* **42**（6），8–11.
6) Devereux, R. F.（1953）. Isaacs-Kidd mid-water trawl. *Oceanog. Equip. Rep.*（1），26.
7) Kason, W. S.（1949）. New type trawl net. *Fish. Gaz.* **66**（11），60–61.
8) Larsson, K. H.（1952）. The phantom pelagic trawl. *Fish. News*（2067）.
9) Barraclough, W. E.（1955）. Canadian mid-water herring trawl. *World Fish.* **4**（8），34–36.
10) 神田献二（1955）. 中層トロールについて. 漁業技術 **1**（1），7–17.
11) Maksheev, V. G.（1954）. Bottom trawl for herring fishing. *World Fish.* **3**（8），290–293.
12) Hodges, T.（1951）. How a trawl looks underwater. *Fish. Bull.* **1**（11）. 7–8,
13) 黒木敏郎（1955）. 電戟漁法. 189p. 東京；技報社.
14) Kawakami, T. & Tsubota, H.（1953）. On the configuration and distribution of tension of a rope in a uniform stream. *Mem. Coll. Agr. Kyoto Univ.*（66），1–10.
15) ————（1955）. Equilibrium configuration of a rectangular strip of net subjected to a uniform current. *Ibid.*（72），1–3.
16) Tauchi, M.（1934）. The force acting on the plane net in motion through the water. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **3**（1），1–4.
17) 田内森三郎（1949）. 水産物理学. 210p. 東京；朝倉.
18) 谷口武夫（1955）. 水中に於ける各種嚢網の抵抗について. 1. 日水誌 **21**（5），291–296.
19) 小林喜一郎（1952）. 曳綱張力計. 北部日本海深海魚田調査報告（3），113–118.

塩辛の細菌学的研究

第11報　細菌のL-アミノ酸酸化能と生細胞内酵素形成について*

故　長　尾　　清
北海道大学水産学部水産細菌学教室

Bacteriological Studies of Shiokara or "Soused Squid"

11. On the activities of L-amino acid oxidizing enzymes in the isolated bacteria and the formation of the enzyme in the living cell

Late Kiyoshi NAGAO

緒　　言

著者は前に塩辛熟成中の呈味の原因は monoamino-N 量の増加に起因するであろうと述べた[1]。イカ肉は新鮮時既に遊離のアミノ酸が多く，塩辛調製時既に aspartic acid, glutamic acid, glycine, alanine, valine, leucine, phenylalanine, tyrosine, arginine, lysine, histidine, proline, serine, threonine, ornithine 等が遊離アミノ酸として検出され，これらのアミノ酸が塩辛熟成中いかなる消長をたどるか paper chromatography にて観測し[2]，又呈味の源と考えられるアミノ酸が細菌の生細胞の内外で，どの様にして生合成され或は代謝されて行くかと言う問題特にグルタミン酸脱水素酵素とアミノ基転移酵素との関連について報告した[3,4]。アミノ酸は生体内において先ず脱アミノを受けるのが最も一般的な代謝経路である。脱アミノの方法には種々あるが，酸素を得てアミノ基を脱しα-ケト酸に移行する所謂酸化的脱アミノはその最も重要なものである。Braunstein & Bychkov[5] は多くのアミノ酸の酸化的脱アミノは，最初アミノ基がアミノ基転移酵素により α-ketoglutaric acid に移行し，生じた glutamic acid が脱水素酵素により脱アミノを受け間接的に脱アミノ系を形成するのであろうとの考えを提唱した。しかしながらかゝる系が実際は生体でアミノ酸の脱アミノにどの程度に関与しているか，又アミノ基転移酵素に関与する脱アミノ機構が存在していても，実際にどのアミノ酸がどの程度迄この機序で酸化されるのか直接知る事は出来ない。

本報においてはかゝる目的で塩辛の熟成に関与する細菌によるL-アミノ酸の酸化能及びL-アミノ酸酸化酵素系の形成について実験した結果について報告する。

実　験　方　法

1) 使用菌株　著者が塩辛中より分離し，今まで本研究で主として使用していた *Bac. subtilis* 及び *Bac. subtilis* sp.（著者が塩辛中より分離した当時は *Bac. mesentricus fuscus* であると記載したが，1948年の Bergey の分類ではこの菌株は *Bac. subtilis* に包含されているので，今まで使用していた *Bac. subtilis* と区別する為に *Bac. subtilis* sp. と記す）と，当教室保存の *Esch. coli* の菌株を使用した。

2) 菌浮遊液調製法　培養基は特に明記しない限り agar-agar を使用し，37°で20時間培養，前報[6] と同じ方法で菌浮遊液を調製した。

3) 酸化能の測定方法　Warburg 検圧計を用いて酸素の消費量を測定した。0.067M 燐酸 buffer液（pH 7.4）1cc, 5×10^{-2}M アミノ酸溶液0.5cc, 菌浮遊液1cc, KOH 0.3cc, gas phase 空気，反応温度 30°。

---

* 本論文は故長尾清氏の遺稿であつて，木村喬久氏これを整理し，谷川英一氏の校閲を経て出版の運びとなつたものである。（編集委員）

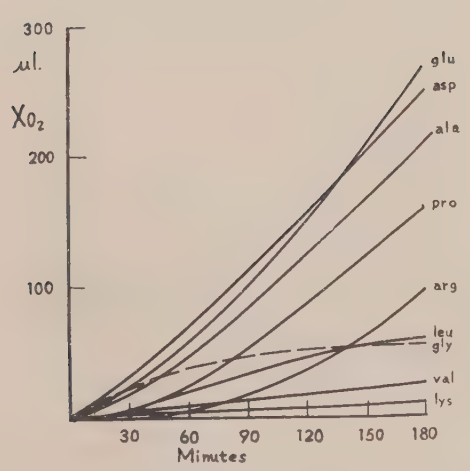


Fig. 1. The velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Bac. subtilis*

The velocity of oxidation was measured manometrically by the rate of oxygen uptake in the presence of excess of substrate. Each manometric cup contained 1cc of bacterial suspension (2mg dry weight/cc), 0.5cc of 5×10^{-2}M substrate and 1cc of 0.067M phosphate buffer of pH 7.4. 0.3cc of alkali in center well. Gas phase, air. Substrate tipped in from side bulbs of Warburg vessels after temp. equilibration, 30°. Oxygen consumption due to autorespiration was subtracted.

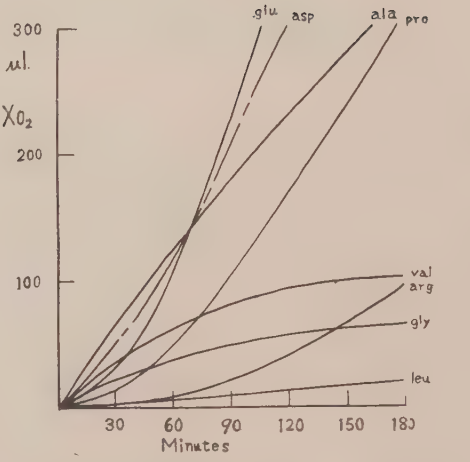


Fig. 2. The velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Bac. subtilis* sp.

The experimental conditions are the same as in Fig. 1.

実 験 結 果

1) アミノ酸の酸化能及び生細胞内で酸化酵素系が形成される速度

細菌のアミノ酸に対する酸化能は，アミノ酸の種類及び菌株により著しく差がある事が知られている[7,8]。著者が本研究で主として使用していた *Bac. subtilis* の菌浮遊液では Fig. 1 に示した結果を得た。即ち L-aspartic acid が最も速かに酸化され，次に glycine, L-glutamic acid, DL-alanine, L-proline, L-leucine, DL-valine, L-lysine, L-arginine の順序で酸化された。この結果をみると L-leucine に対する酸化能は *Proteus vulgaris*[7)8)] より非常に微弱であるが，aspartic acid, alanine, 及び glutamic acid の様なアミノ基転移に大いに関与するアミノ酸に対する酸化能が大である事と proline に対する酸化能が大である事に注目される。

今菌細胞の酸素消費速度が，L-アミノ酸酸化酵素の存在量で決定されると仮定すると，Fig. 1 の曲線は酵素形成の時間的変化を表わすことになる。Aspartic acid, glutamic acid 及び alanine に対しては反応と同時に酸素の消費がみられるが，或る時期をすぎると，酸素消費速度は加乗的に増大している。即ち適応的に酵素が形成されている事を示している。Glycine に対しては反応と同時に酸素が消費されるが，次第に酸素消費速度は減衰している。即ち酵素の崩壊を意味する。Proline, leucine 及び arginine に対しては初め殆んど酸素の消費がみられないが，lag phase 後酸化酵素系が形成されている。

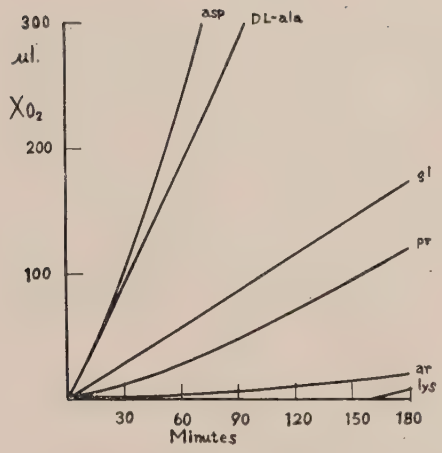


Fig. 3. The velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Esch. coli*
The experimental conditions are the same as in Fig. 1.

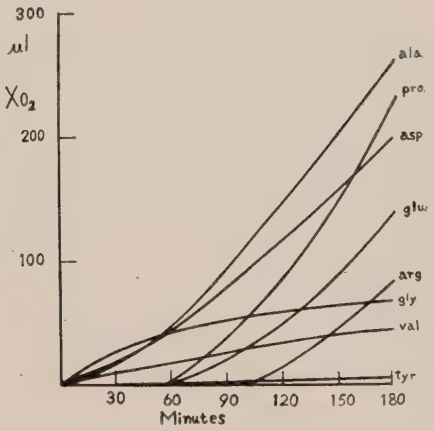


Fig. 4. The velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Bac. subtilis* which grown in agar-agar contained amino acid mixtures
Bacteria was grown in agar-agar which contained 1cc of 2.5×10^{-2}M L-aspartic acid, DL-alanine, L-proline, DL-valine, L-leucie, L-lysine, L-arginine, L-glutamic acid, DL-ornithine, and L-tyrosine per 100cc of broth. The experimental conditions are the same as in Fig. 1.

之等の事が他の菌株についても云い得るか否かを比較検討するため，著者が塩辛中より分離した *Bac. subtilis* に属する他の菌株（*Bac. subtilis* sp. と記す）について同様の実験を行い，その結果を Fig. 2 に示した。即ちこの菌株では前に使用した菌株に比し各アミノ酸に対する酸化能は大であり， DL-alanine が最も速かに酸化され，次いで L-aspartic acid, DL-valine, L-glutamic acid, glycine, L-proline, L-arginine, L-leucine の順序で酸化された。前の菌株と同様に leucine に対する酸化能は微弱であるが，アミノ基転移に大いに関与する aspartic acid, alanine, 及び glutamic acid 等のアミノ酸及び proline に対する酸化能が大である事が認められた。 Alanine, glutamic acid, aspartic acid に対しては反応と同時に酸素の消費が起り，次第に速度を増し，酵素の形成が明らかに観察される。Proline に対しては約 30分の lag phase の後急激な酵素形成が起る。Glycine, valine に対しては反応と同時に酸素の消費が起るが，約100分の後酸素の消費は停止し，酵素の崩壊が起つている。 Arginine に対しては初め殆んど酸素の消費がみられないが，約 60～90分の lag phase 後酵素が形成されている。

Bac. subtilis は Gram 陽性の菌である。一般に Gram 陽性菌と Gram 陰性菌とでは栄養要求及び細胞膜の透過性に顕著な差異がある事が知られている。Gram 陰性の菌についでアミノ酸の酸化能及びL-アミノ酸酸化酵素系の形成速度をみるために，当教室保存の *Esch. coli* の菌株を使用して同様の実験を行い，その結果を Fig.3 に示した。即ち L-aspartic acid が最も速やかに酸化され，次いで DL-alanine, L-glutamic acid, L-arginine 及び L-lysine の順序で酸化された。 L-leucine に対しては全然酸化がみられなかつた。又これ等のアミノ酸に対しては反応と同時に酸素の消費がみられた。L-lysine の場合約160分の lag phase の後僅かに酸素の消費が観察された。

細菌の菌体内で酵素が形成される場合，細菌の発育時の環境条件に大いに支配される。その形成を左右する重要な要素となるものは，培地中の基質の有無，培地 pH，発育温度，菌体内への基質の透過性，補欠分子族の存在の有無，及び細菌が補欠分子族を生合成し得るや否や等である。この中発育時の基質の存在の有無による影響については基質を含まない培地に発育させた菌体について検討すればわかるが，基質を含まない培地においても菌が発育するという事は菌体構成の蛋白質を生合成している事を意味するのであるから，基質がL-アミノ酸である場合非常に困難な問題となる。今まで述べて来た実験は細菌を agar-agar 培地に培養し，その菌の浮遊液について得られた結果である。Agar-agar 培地は色々なアミノ酸が含まれていると思われるが，今 agar-agar 培地 100cc 中に L-aspartic acid, DL-valine, DL-alanine, L-proline, L-lysine, L-leucine, L-arginine, glycine, L-glutamic acid, DL-ornithine 及びL-tyrosine の各アミノ酸の2.5×10^{-2} M溶液1 cc ずつ全部加えた培地に発育させ，その菌浮遊液について実験した結果を Figs. 4及び5に示した。

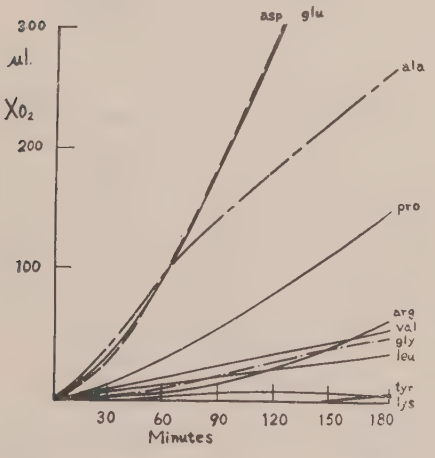


Fig. 5. The velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Bac. subtilis* sp. which grown in agar-agar contained amino acid mixtures
The experimental conditions are the same as in Fig. 4.

Bac. subtilis の場合，普通 agar-agar 培地に発育させた場合と同じ様な酸化能をもつているが，たゞ酵素形成のための lag phase がやゝ長い事と，L-leucine 及び L-lysine に対しては全然酸化がみられなかつた。この原因は発育時培地中の基質の濃度や基質相互間の拮抗作用に起因しているのではなかろうか。

Bac. subtilis sp. の菌株の場合，普通 agar-agar 培地に発育させた場合に比し，DL-valine に対する酸化能が弱い事と，L-proline に対しては酸化酵素の形成量が少ない様である。

2) Cell free 標品によるアミノ酸の酸化能

生細胞内で酵素が適応的に形成されたか否かを論ずる場合には，基質に対する細胞膜の透過性と安定性と吟味しなければならない。

著者は agar-agar 培地で培養した菌体及びこの菌体を L-aspartic acid の溶液に30°，100分接触させた菌体を著者が作製した冷結真空乾燥装置[9]を用い，乾燥菌体粉末を作り，この菌体粉末の水溶液についてアミノ酸の酸化能を測定した結果を Figs. 6及び7に示した。即ち agar-agar 培地に培養した菌体の乾燥粉末では DL-alanine, L-glutamic acid 及び L-aspartic acid に対して微弱ながら酸化能がある。DL-valine, L-lysine, L-tyrosine, glycine, L-leucine, L-proline 及び L-arginine に対しては酸化作用がない。L-aspartic acid に30°，100分接触させた菌体の乾燥粉末では DL-alanine, L-aspartic acid 及び L-glutamic acid に対して強い酸化作用がみられ L-tyrosine, L-lysine, DL-valine, glycine, L-arginine, L-leucine に対して微弱ながら酸化作用がみられた。即ち L-aspartic acid と接触させる事によつて適応的に酸化酵素系が形成されている事を示す。

尚非適応菌及び L-aspartic acid 適応菌からの cell free 標品でも lag phase がみられるのは Stumpf & Green[7]も述べている様に L-アミノ酸酸化酵素は細胞内の不溶性構成々分と結合しているため，乾燥粉末から水溶液中に溶出するのに時間を要するためであると思われる。

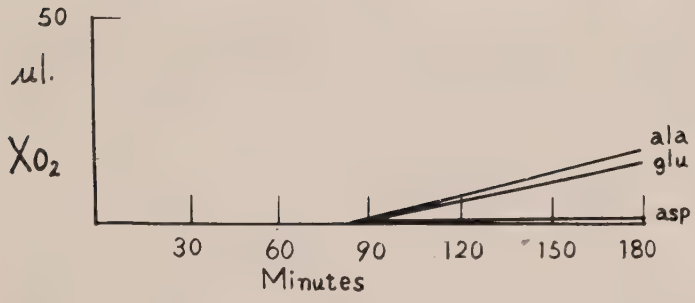


Fig. 6. The velocity of oxidation of amino acids by cell free enzyme of *Bac. subtilis*

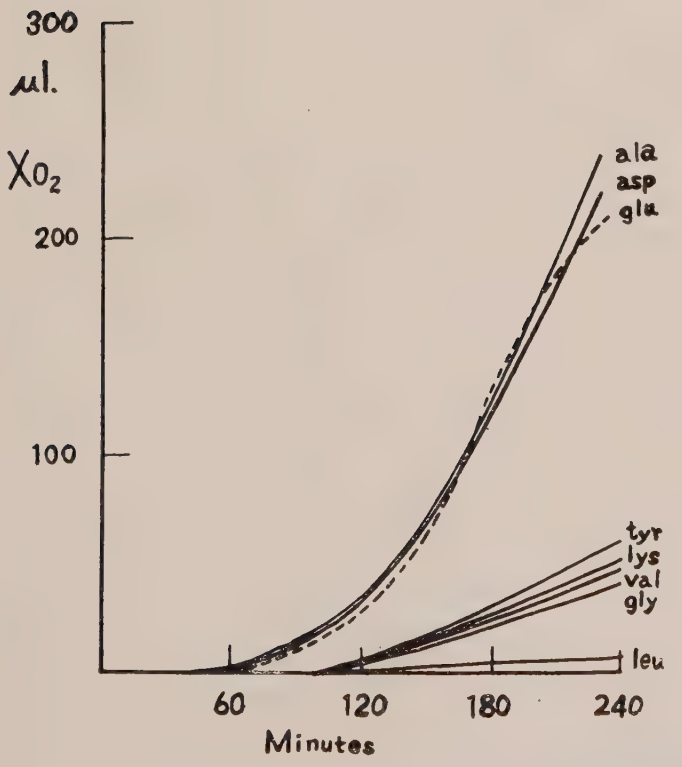


Fig. 7. The velocity of oxidation of amino acids by cell free enzyme which is extracted from the cells adapted with L-aspartic acid

考　　察

細菌のアミノ酸に対する酸化能は，アミノ酸の種類及び菌株により著しく差がある事が知られている[7][8]。基質の分子構造とか菌株の種類とかに一定の法則を見出し難い。著者の実験結果と非常に似た結果がWolf[11]により報告されている。即ちペニシリンの生産に使用する *Penicillium notatum* Q176 の菌体が22種のアミノ酸をそれぞれ異なる速度で酸化するが，alanine, glutamic acid 及び proline が最も速かに酸化されると述べている。又Krebs[12]は新鮮なネズミの腎臓は他のアミノ酸よりもaspartic acid及び glutamic acid を最も速かに酸化すると述べている。

著者の実験結果で酸化され易いアミノ酸はその基質が完全酸化された場合に消費する酸素の量より遙かに多量の酸素を消費する事がある。このような事実をStumpf & Green[7]も経験している。恐らく酸化的脱アミノを受けて生成された α-ケト酸が実際に代謝されたためであろう。

宇佐美等[8][10]は *Proteus vulgaris* 等の 2, 3の腐敗菌がL-アミノ酸を強く酸化するが，これ等の菌はglucoseの酸化作用が比較的弱く，アミノ酸酸化の際に有機燐酸のエステル化を随伴することが認められるので，アミノ酸の酸化によりエネルギーを獲得し，このエネルギーを利用して酵素形成，生長，増殖等を行つていると考えられると述べている。著者が使用した *Bac.*

subtilis の菌株も glucose の酸化が比較的弱く，後で述べる様に酸化的燐酸エステル化を阻害する 2, 4-dinitrophenol 及び azide 等による影響よりみてアミノ酸酸化の際に有機燐酸のエステル化を行いエネルギーを獲得し，同時に酸化される速度の速い alanine, glutamic acid や aspartic acid の様なアミノ酸は自から代謝されながら，それぞれのケト酸を生じ，菌体内に透過し菌体内においてアミノ基転移酵素[13]により他のアミノ酸を形成し，蛋白質構成素材として高分子化に関与するものであろうと思われる。

酵素蛋白の適応的形成の機構について Karstöm は構成酵素と適応酵素とに分けたが，その後 Monod は Karström の説を批判し，構成酵素も適応酵素も全く同一の機構で生細胞内で形成されるという一元論説を提唱した。一方Spiegelmanはplasmageneの自己増殖と言う点からplasmagene 説を提唱した。須田等[8,9,10,14,15,16,17]は酵素蛋白の形成の lag phase において inducer の作用下に素材アミノ酸の質的量的な集約の過程を経て，素材アミノ酸から dynamic precursor protein への高分子化(incorporation)の過程が行われ，次いでlag phase において precursor から特異な酵素蛋白への分化(differentiation)が行われる。Precursor は素材から蛋白質への過程の遷移的な物質として，しかも一定の範囲内で（例えば同一の系或は相互転化可能な系の）種々な蛋白質への分化し得る形で存在し，この段階で一応の特異性を持つが，最終的な特異性が決るのは分化の過程が完了する段階である。一度形成された酵素蛋白は自から代謝機能を果すと同時に崩壊しつゝ，cyclic な機構により再生産され，その動的な平衡状態を反映して蛋白質の消長が観察されると述べている。

又 Spiegelman はアミノ酸類似物を用いて，酵母における酵素形成について実験し，酵素蛋白合成は遊離のアミノ酸を主な窒素源として用いる事を明らかにした。

しかし特殊な蛋白合成に必要なアミノ酸群が定常的に細胞内に存在することは考えにくいし，enzyme precursor が細胞内に常にあるとも思われない。むしろ与えられた基質の影響下に lag phase の間にprecursor が形成される。そのために先ず不可缺のアミノ酸の形成が起らなければならないと考えられる。実際に種々なアミノ酸の形成が lag phase の間に起るならば glutamic acid, aspartic acid, alanine のようにアミノ基転移系により自から代謝されながら他のアミノ酸を形成するような特殊な位置にあるアミノ酸は単に酵素蛋白構成素材として高分子化に関与するだけのアミノ酸の果す役割と必然的に異なる筈である。

著者の実験結果から aspartic acid, alanine, glutamic acid 及び proline 等のアミノ酸を基質とすると酸化速度速く，しかもその基質と接触する事によつてアミノ酸酸化酵素系形成量も大である。それ以外のアミノ酸を基質とすると酸化速度が遅く，しかもそれ等の基質と接触する事によつて形成されるアミノ酸酸化酵素系の形成量も少ない。これらの事より酸化され易いアミノ酸は酸化的脱アミノを受け対応するケト酸が菌体外において作られ，この際エネルギーを獲得し，このエネルギーを利用してそれぞれのケト酸が菌体内に透入し，菌体内においてアミノ基転移酵素の作用により他のアミノ酸を生成し，酵素蛋白や菌体蛋白の形成に関与しているものであろう。酸化され難いアミノ酸は恐らく arginine の場合のようにそのまゝ遊離の状態で細胞膜を透過している[5]のではなかろうか。菌体内に透入するケト酸は微量でも充分に他のアミノ酸に転移し得るであろうし，余分なケト酸は細胞外において速かに代謝されるのであろう。

L-アミノ酸酸化酵素は基質であるアミノ酸の種類によつて補欠分子族その他の性質が異なる酵素蛋白である事が知られている。最近八木・奥田[20]は *Esch. coli* の菌株を glucose を含む合成培地に培養し休止菌とした場合，アミノ酸の酸化は殆んど認められないが，これに alanine を基質として適応実験を行うと約30分の lag phase 後アミノ酸酸化酵素が適応的に形成されるか，この場合適応する迄の lag phase の間に FAD が多いか少いかによつて酵素形成量が左右されると述べている。アミノ酸の種類によつて酸化される速度に差があり，又酸化酵素形成時の lag phase の長さに差異がある原因として補欠分子族の形成速度に依るのかも知れない。

要　　約

塩辛の熟成中の呈味の原因と考えられるアミノ酸が生細胞の内外でどのようにして生合成され，或は代謝

されて行くかという問題特に Braunstein 等が提唱したアミノ酸の酸化的脱アミノとアミノ基転移との系について実際にどのアミノ酸がどの程度この機序で酸化されるかを研究し，併せてアミノ酸酸化酵素系の形成という問題について解析をこゝろみた。即ち L-aspartic acid, DL-alanine, L-glutamic acid 及び L-proline 等のアミノ酸を基質とすると酸化速度が速く，しかもその基質と接触する事によつて酸化酵素形成量も大である。それ以外のアミノ酸を基質とすると酸化速度が遅く，しかもそれ等の基質と接触する事によつて形成されるアミノ酸酸化酵素量も少ない。

これ等の事より酸化され易いアミノ酸は酸化的脱アミノを受け対応するケト酸が菌体外において作られ，この際エネルギーを獲得し，このエネルギーを利用し，それぞれのケト酸が菌体内に侵入し，菌体内においてアミノ基転移酵素の作用により他のアミノ酸を生成し，酵素蛋白や菌体蛋白の形成に関与しているものであろう。酸化され難いアミノ酸は恐らく L-arginine の場合のようにそのまゝ遊離の状態で細胞膜を透過し，菌体内において代謝されるものであろうと考察される。

文　　献

1) 長尾・木村（1951）. 北大水産彙報 **1**, 81.
2) ———— （1953）. 同　誌 **3**, 259.
3) ———— （1954）. 同　誌 **5**, 62.
4) ———— （1954）. 同　誌 **5**, 68.
5) Braunstein, A, E. & Bychkov, S. M. (1939). *Nature* **144**, 351.
6) 長尾（1954）. 北大水産彙報 **5**, 55.
7) Stumpf, P. K. & Green, D. E. (1944). *J. Biol. Chem.* **153**, 387.
8) 宇佐美・佐々木・牧野（1953）. 生物科学シムポジウム進化特集号 49.
9) 長　尾（1953）. 北大水産彙報 **4**, 96.
10) 宇佐美・金子・仲尾（1954）. 酵素化学シムポジウム **9**, 122.
11) Wolf, F. F. (1948). *Arch. Biochem.* **16**, 103.
12) Krebs, H. A. (1935). *Biochem. J.* **29**, 1620.
13) 長　尾（1954）. 北大水産彙報 **5**, 68.
14) 須田・早石・尾田（1949）. 酵素化学シムポジウム **1**, 73.
15) 須　田（1950）. 同　誌 **4**, 11.
16) 直野・須田・尾田（1952）. 同　誌 **7**, 24.
17) 直野・須田（1953）. 同　誌 **8**, 27.
18) 須田・直野・井上（1954）. 同　誌 **10**, 238.
19) 直野・須田（1954）. 同　誌 **9**, 88.
20) 八木・奥田（1954）. 同　誌 **10**, 219.

塩辛の細菌学的研究

第12報　細菌の発育時に培地中に存在する Glucose がL—アミノ酸酸化酵素形成に及ぼす影響について

故　長　尾　　清
北海道大学水産学部水産細菌学教室

Bacteriological Studies of Shiokara or "Soused Squid"

12. Influence of glucose on the formation of L-amino acid oxidizing enzymes in the isolated bacteria during growth

LATE Kiyoshi NAGAO

緒　　言

前報[1]において塩辛の熟成中の呈味の源と考えられるアミノ酸が生細胞の内外でどのようにして生合成され或は代謝されて行くかと云う問題特に Braunstein 等[2]が提唱したアミノ酸の酸化的脱アミノとアミノ基転移との系について，実際にどのアミノ酸がどの程度この機序で酸化されるかを研究し，併せてアミノ酸酸化酵素系の形成と云う問題即ちひいては一般的な蛋白質の生合成の機作の一面について解析をこゝろみた。

本報においては細菌の発育時培地中に存在する glucose 及び pH がL-アミノ酸酸化酵素系形成にどのように影響するかについて実験した結果について報告する。

実　験　方　法

使用菌株，培養法，菌浮遊液の調製法，酸化能の測定方法は前報[1]に記載した通りである。

実　験　結　果

1）細菌の発育時に培地中に存在する glucose が L-アミノ酸酸化酵素系形成に及ぼす影響について

Bac. subtilis, Bac. subtilis sp. 及び *Esch. coli* の菌株を2% glucose agar 培地に培養し，これらの菌の浮遊液についてアミノ酸化能を測定した結果を Figs. 1, 2 及び 3 に図示した。即ち *Bac. subtilis* の場合アミノ酸の酸化能は非常に弱まり，しかもアミノ酸酸化酵素の形成も始んど表われず僅かに DL-alanine 及び L-arginine が基質である場合に少量の酵素形成がみられる。L-lysine 及び L-tyrosine に対しては酸化作用はなかつた。*Bac. subtilis* sp. の場合，DL-alanine, glycine 及び DL-valine に対する酸化能は agar-agar 培地で培養した菌体と同様反応と同時に酸素の消費がみられるがその活性は弱い。L-aspartic acid, L-proline, L-glutamic acid, L-leucine が基質である場合，酵素形成のための lag phase が長くなり，酵素形成量も少ない。L-tyrosine に対して酸化作用はない。*Esch. coli* の場合 L-aspartic acid, DL-alanine, L-glutamic acid 及び L-proline に対する酸化能は agar-agar 培地で培養した菌体では反応と同時に酵素の消費がみられたか，glucose agar 培地で培養した菌体では20～30分の lag phase がみられ酵素形成量も少ない。基質が L-glutamic acid である場合には80分以後酵素の崩壊がみられる。L-tyrosine に対して微弱な酸化作用が反応と同時に起り，L-arginine に対しては約80分の lag phase の後微量ながら酵素が形成

* 本論文は故長尾清氏の遺稿であつて，木村喬久氏これを整理し，谷川英一氏の校閲を経て出版の運びとなつたものである。（編集委員）

されている。

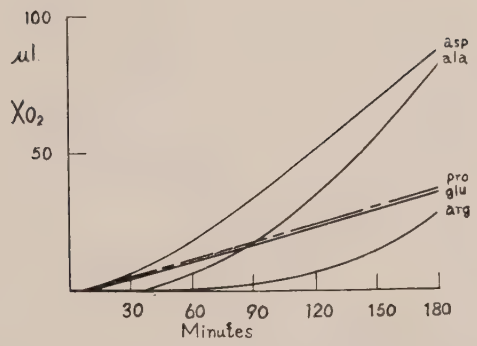


Fig. 1. The velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Bac. subtilis* which grown in 2% glucose agar

The velocity of oxidation was measured manometrically by the rate of oxygen uptake in the presnce of excess of substrate. Each manometric cup contained 1cc of bacterial suspension (2mg. dry weight/cc), 0.5cc of 5×10^{-2} M substrate and 1cc of 0.067M phosphate buffer of pH 7.4. 0.3cc alkali in center well. Gas phase, air.

Substrate tipped in from side bulbs of Warburg vessels after temp. equilibration, 30°. Oxygen consumption due to auto-respiration was substracted.

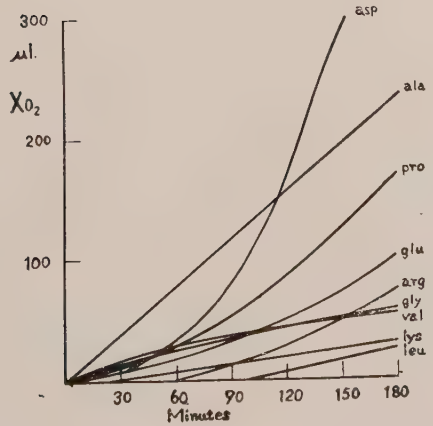


Fig. 2. The velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Bac. subtilis* sp. which grown in 2% glucose agar

The experimental conditions are the same as in Fig. 1.

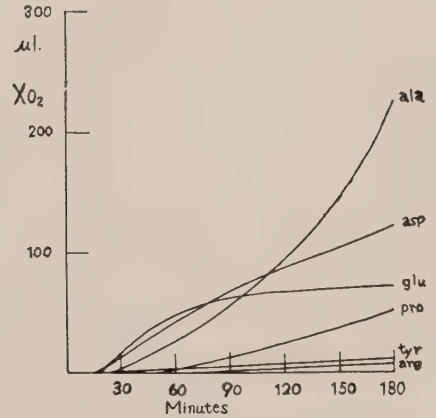


Fig. 3. The velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Esch. coli* which grown in 2% glucose agar

The experimental conditions are the same as in Fig. 1.

Stephenson & Gale[3] は *Esch. coli* のalanine, glycine 及び glutamic acid に対する酸化酵素の形成が発育時に glucose が存在していると，どの様な影響を及ぼすかについて研究し，glucose を加えないアミノ酸培地に発育した菌の酵素量は glucose を含む培地で発育した菌の酵素量の約20倍に達する。しかし glucose を加えないアミノ酸培地に発育した菌の浮遊液に glucose を加えてもこの菌のアミノ酸酸化酵素の活性には何等の影響もない。それ故 glucose は細胞内に酵素がつくられてしまつた後に作用するものでなく，発育中に起る酵素形成を阻害するものであらうと述べている。*Bac. subtilis* を agar-agar 培地に培養した場合 L-glutamic acid に対する酸化酵素は構成酵素として存在しているが，この菌の浮遊液に10^{-2} M glucose を加えた場合のL-glutamic acid に対する酸化能をしらべた結果を Fig. 4 に図示した。即ち glucose の存在により L-glutamic acid に対する酸化酵素の活性は減少した。

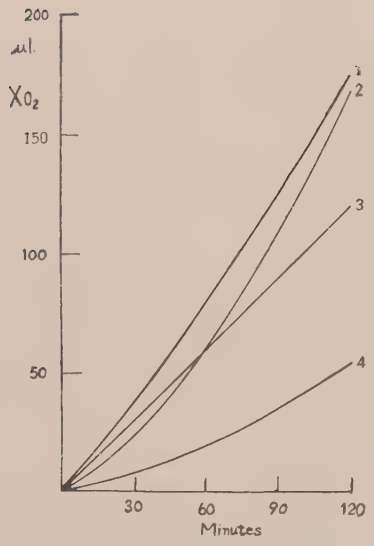


Fig. 4. The effect of addition of glucose to washed suspensions of *Bac. subtilis* on the L-amino acid oxidase activivities of the cells
Curve 1. Glucose + glutamic acid
Curve 2. No addition of glucose, glutamic acid only.
Curve 3. Glucose
Curve 4. Curve 1–Curve 2

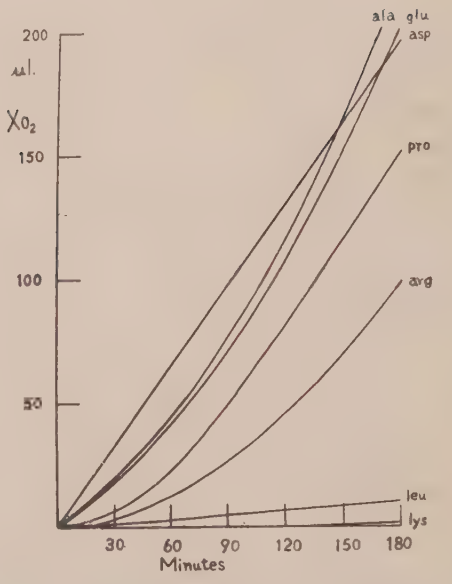


Fig. 5. The velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Bac. subtilis* which grown in agar-agar adjusted to pH 6.2
The experimental conditions are the same as in Fig. 1 with the exception of 0.067M phosphate buffer (pH 6.2) used.

2) 細菌の発育時の培地pHの影響

塩辛の熟成時の pH は約 6.2である。*Bac. subtilis* を 2% glucose agar 培地に培養した後の培地 pH約 6.2である。前記の測定はすべて agar-agar 培地 (pH7.0) に発育した菌の浮遊液について，反応 pH7.4で行つた実験である。この pH がかならずしも細菌アミノ酸化酵素の最適 pH であるとは云い得ない。基質の種類及び菌株によつてアミノ酸化に対する最適 pH が異なる可能性も全然排除出来ない。アミノ酸の酸化能の弱い細菌でも pH を変化させれば，或はより強い酸化が起るかも知れない。

Bac. subtilis を agar-agar 培地 (pH6.2) に培養した菌の浮遊液について反応 pH 6.2 で測定した場合のアミノ酸の酸化能及び酸化酵素形成について実験した結果を Fig. 5 に図示した。即ち培地 pH 7.0，反応 pH 7.4 の場合に比し，やゝ酵素活性及び酵素形成が減少しているに過ぎない。L-arginine に対しては酵素形成のための lag phase がやゝ短縮されているが，生成された酵素の全量には殆んど変らない。一般に L-histidine 等の塩基性アミノ酸に対する細菌の脱アミノ酵素は pH6.0 附近に最適 pH を有している事が知られているが，著者の実験結果では pH が酸性側になつてもあまり変化がない事を示している。

Bac. subtilis を agar-agar 培地 (pH 7.0) に培養した菌の浮遊液について反応 pH 6.2 で測定した場合のアミノ酸酸化能とアミノ酸酸化酵素系の形成について実験した結果を Fig. 6に図示した。即ちこの場合も pH7.0 反応 pH7.4の場合に比しやゝ酵素活性及び酵素形成が減少しているに過ぎない。

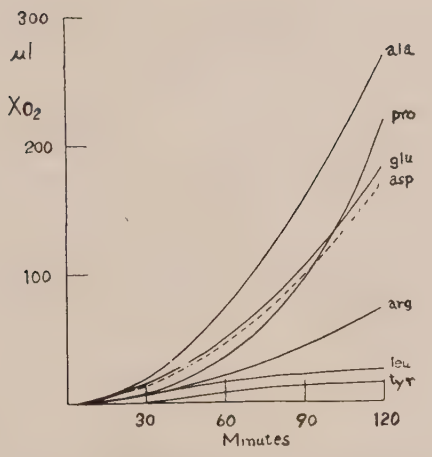


Fig. 6. The velocity of oxidations of amino acids by cell suspensions of *Bac. subtilis* which grown in agar-agar adjusted to pH 7.0
The experimental conditions are the same as in Fig. 1 with the exception of 0.067M phosphate buffer (pH 6.2) used.

考　　察

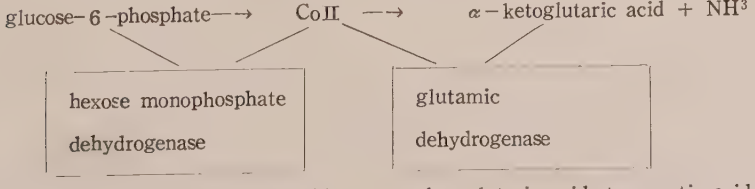
適応酵素の形成は微量の基質の存在下で行われるが，しかし特異基質以外の物質が，酵素の形成または活性に或る役割を演ずることがある。その最も著しい例が培地に醱酵をうける炭水化物が存在する場合である。かゝる場合色々な酵素の活性又は形成を阻害する事が知られている。その要因として，

1. 酸の形成とその結果起る培地 pH の変化
2. 嫌気状態を伴うガスの形成
3. 菌塊の著明な増加
4. 発育中や醱酵中の細胞内における一時的な多糖類の形成
5. Protein sparing 作用

等があげられているが，現在の所酵素の形成に対する炭水化物の影響を以上5つの要因と関連させるにはいたつていない。

Esch. coli を glucose と galactose の混合物で発育させると構成酵素である glucozymase の形成が適応酵素としての galactozymase の形成を抑制する。これについて Monod は酵素抑制 (enzyme suppression) によるものだと考えている。この抑制の機構については未だ不明な点が多いが，Galeは両酵素は共に或る限られた量の蛋白をその precursor としてもつために構成的な glucozymase がつくられる時にその precursor が消費され，適応的 galactozymase がつくられなくなるだらうと述べている。

著者の実験結果では *Bac. subtilis* の場合 glucose の影響は培地 pH の変化にも影響されるが，これのみによつては説明されない。Aspartic acid, alanine, glutamic acid及びprolineのようなアミノ酸は速かに酸化されて，それぞれのケト酸が菌体外において作られ，それと共に有機燐酸のエステル化を随伴し，エネルギーが遊離される。こゝで生成されたケト酸が菌体内に透入し，菌体内においてアミノ基転移酵素により他のアミノ酸を生成したり，酵素蛋白や菌体蛋白の生成に関与しているだろうと述べたが，glucose が代謝された場合に中間代謝産物として pyruvic acidやoxalacetic acid の様なケト酸の生成が当然考えられるので glucose による酵素活性及び酵素形成量の低下は或る限られた量の蛋白をその precursor としてもつためであるとは考えにくい。むしろ補酵分子簇或は助酵素の行動によつて説明した方が妥当であると考えられる。即ち今糖の代謝，glutamic dehydrogenase 及び transaminase の系を考えた場合



その結果 glucose-6-phosphate + oxalacetic acid + NH_3 = phosphoglyceric acid + aspartic acid 最初に glutamic acid がこれに連結している dehydrogenase によつて α-ketoglutaric acid がつくられ，次に tramsaminase の存在によつてアミノ基が oxalacetic acid に転移されて aspartic acid がつくられ，そして α-ketoglutaric acid と glutamic acid とは差引されてしまう。事実 α-ketoglutaric acidがNH_3 の運搬体として触媒的に作用しており，これは丁度助酵素が水素の運搬体として作用しているものと同じであつて，glucose-6-phosphate の酸化によつてこれら3つの酵素と2つの運搬体の助けをかりて oxalacetic acid のアミノ化が行われている系が考えられる。この場合 CoII がどちらの dehydrogenase に使用されるか，両方の dehydrogenase に使用されるなら CoII の量が問題になる。黴や細菌の glucose oxidase はL-アミノ酸酸化酵素と同一の flavin を有する他の flavoprotein であり，*Penicillium notatum* は glucoseを酸化して gluconic acid と H_2O_2 を生成する事が知られている。するとL-アミノ酸酸化酵素と glucose oxidase とで flavin を共晒する事になり flavin の量が問題になる。

次に flavoprotein と DPN との関連について次の様な系も考えられよう。

glucose + 2 DPN ⇄ 2 $CH_3 \cdot CO \cdot COOH$ + 2 DPN H_2

2DPN H_2 + 2 flavoprotein ⇄ 2 red. flavoprotein + 2DPN

2 red. flavoprotein + 2 $CH_3 \cdot CO \cdot COOH$ + NH_3 ⇄ 2 flavoprotein + 2 $CH_3 \cdot CH \cdot NH_2 \cdot COOH$ + H_2O

以上の点から考察すると glucose によるアミノ酸酸化酵素の活性及び酵素形成に及ぼす影響は補欠分子族或は助酵素の行動にも起因すると思われる。

要　　約

細菌の発育時に培地中に存在する glucose はL-アミノ酸酸化酵素の活性及び酵素形成を阻害する。この要因として糖の存在による酸の形成とその結果起る培地 pH の変化のみによつて glucose による阻害機構は説明出来ない。むしろ酵素の補欠分子族或は助酵素の行動によつて説明した方が妥当であろうと考察した。

文　　献

1) 長　尾 (1956) 北大水産彙報 **7** (1), 31.

2) Braunstein, A. E. & Bychkou, S. M. (1939). *Nature* **144**, 351.

3) Stephenson,M. & Gale, E. F. (1937). *Biochem. J.* **31**, 1316.

4) Keilin, D. & Hartree, E. F. (1948). *Biochem. J.* **42**, 221.

塩辛の細菌学的研究

第13報　細菌のL-アミノ酸酸化酵素の特異性について*

故　長　尾　　清
北海道大学水産学部水産細菌学教室

Bacteriological Studies of Shiokara or "Soused Squid"

13. On the special characteristics of L-amino acid oxidizing enzymes in the isolated bacteria

Late Kiyoshi Nagao

緒　　言

L-アミノ酸酸化酵素のアミノ酸の種類に対する特異性については不明な点が多い。光学的異性体に対して特異性を有するL-アミノ酸酸化酵素とD-アミノ酸酸化酵素が知られている。下等生物の代謝生産物或は菌体構成成分としてD系アミノ酸を含んだペプチド或は特種なD-アミノ酸自身が発見されつつあり，これらのうちには強い抗菌性或は毒性を示すものがあるが，この様な生理作用は立体配置を異にするアミノ酸を構成成分としている事による分子形態の変化によるものと考えられるが，D-アミノ酸自体の生理作用については未だ明らかになつていない。それ故にD-アミノ酸酸化酵素の生理的意義は不明であるが，D-アミノ酸分子はD-アミノ酸酸化酵素の作用により相当するケト酸に変形され，次にアミノ基転移によつてL-アミノ酸に変形する機会を待つているものであろう。然し動物組織或は微生物のD-アミノ酸酸化酵素もL-アミノ酸酸化酵素もアミノ酸の種類によつて酸化する速度が異なるのに，これが同一のD-アミノ酸酸化酵素或はL-アミノ酸酸化酵素によるものか，基質に対して特異性を有する数種の酸化酵素の混合によるものか明らかになつていない。それで Krebs は一応次の様に分類している[1]。

1) General D-amino acid oxidases
   1. Mammalian D-amino acid oxidase
   2. D-amino acid oxidases of molds
   3. Bacterial D-amino acid oxidases
2) General L-amino acid oxidases
   1. Mammalian L-amino acid oxidases
   2. Ophio-L-amino acid oxidases
   3. L-amino acid oxidases
   4. Bacterial L-amino acid oxidases
3) Specific amino oxidases
   1. Specific D-amino acid oxidases (aspartic acid)
   2. Specific L-amino acid oxidases (glutamic acid, cysteine, proline and hydroxyproline, phenylalanine and tyrosine, histidine)
   3. Specific -amino acid oxidases (glycine, ornithine, and lysine)

---

* 本論文は故長尾清氏の遺稿であつて，木村喬久氏これを整理し，谷川英一氏の校閲を経て出版の運びとなつたものである。（編集委員）

Stumpf & Green[2] は "L-amino acid oxidase of Proteus vulgaris" という名で呼んで特に区別しているが，この酵素の酸化能は菌浮遊液では21種のアミノ酸を酸化するが，この菌から得られた cell free 標品では11種のアミノ酸を酸化するに過ぎない。この中 norleucine が最も強く酸化され，次いで phenylalanine, leucine, tryptophane, methionine, tyrosine, norvaline, histidine, arginine, isoleucine, α-aminobutyric acid の順で活性は弱くなる。菌浮遊液では glycine, serine 及び proline に対する酸化酵素が最も不安定で，次に alanine, valine, aspartic acid 及び glutamic acid に対する酸化酵素がやゝ安定であるが，0°で1週間及び38°で24時間放置した菌浮遊液で酸化されるアミノ酸は cell free 標品が酸化し得るアミノ酸と一致する。これらの事実より Green 等は ***Proteus vulgaris*** の菌浮遊液には数種のアミノ酸酸化酵素が混在しているのであろうと述べている。

本報においては *Bac. subtilis* sp. の菌浮遊液の各種アミノ酸の酸化能に対する酵素阻害剤の影響，食塩の影響，食塩に対する適応性及び酵素の安定度を比較し，これら菌浮遊液には基質に対する特異性を有する数種の酸化酵素があるか否かについて実験した結果について報告する。

実 験 方 法

1. 使用菌株　著者が塩辛中より分離した *Bac. subtilis* sp. の菌株。
2. 菌浮遊液調製法　前報に記載した通りである。
3. 酸化能の測定法　前報に記載した通りである。但し酵素阻害剤を用いる場合には0.067M燐酸 buffer 液（pH 7.4）0.5cc, 5×10^{-2}Mアミノ酸 0.5cc, 阻害剤 0.5cc, KOH 0.3cc, gas phase 空気，反応温度 30°，菌浮遊液 1 cc.

実 験 結 果

1） 阻害剤の影響

一般に酵素に対する阻害剤の行動には次の様な場合がある。

1. 酵素の補欠分子簇と阻害剤とを初めに結合させる。
2. -SH基，-OH 基或は -COOH 基等の必須の反応性側鎖を破壊し若くは結合させる。
3. Spartial configuration の変化即ち蛋白分子の立体構造の変化で所謂変性。
4. 基質と構造類似の物質と酵素の active center を結合させ，基質に対する酵素作用を阻害させる。
5. 酸化的燐酸エステル化の阻害。

等があげられる。これ等の各項目に対する阻害剤の行動がわかれば酵素の異同を区別する事が出来るか，現在は不明な点が多いので，一応酸化酵素及び酸化的燐酸エステル化の阻害剤と言われる methylene blue, azide, sodium dehydroacetate, 2.4-dinitrophenol, KCN, crystal violet, caprylic alcohol 及び benzoic acid に対する挙動よりアミノ酸酸化酵素の特異性の問題について解析しようとした。

実験結果を Table 1 に表示した。酸素吸収量は反応後最初の20分間に消費する酸素の量を測定したものである。Caprylic alcohol の飽和溶液中ではいずれの基質に対しても完全に酵素活性は阻害された。終末濃度10^{-2}M の benzoic acid でもいずれの基質に対しても酵素活性は完全に阻害された。

2） 食塩による影響及び食塩に対する適応性

著者は前に *Bac. subtilis* の glutamic dehydrogenase 活性に対する食塩の影響及び食塩に対する適応性について報告した。即ち普通 agar-agar 培地（食塩無添加）に発育した菌体の浮遊液では基質溶液中に食塩が存在すると酵素作用は阻害される。この同じ菌浮遊液を食塩を加えた基質に30°，3時間接触させても，基質溶液中に食塩が存在すると methylene blue は還元されない。食塩含有の培地で発育した菌の酵素活性は食塩を含まない普通 agar-agar 培地に発育した菌の酵素活性より弱い。食塩含有の培地で発育した菌の浮遊液でも反応系中に食塩が存在すると酵素活性は表われなかつた。

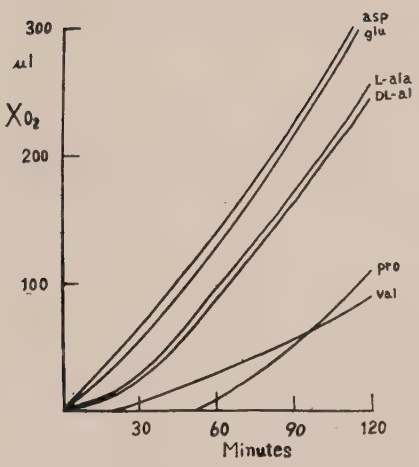


Fig. 1 Effects of the presence of sodium chloride during growth on the activities of L-amino acid oxidases

The velocity of oxidation was measured manometrically as usual. Each manometric cup contained 1cc of bacterial suspensions (2mg dry weight/cc), 0.5cc of 5×10^{-2}M substrate and 1cc of 0.067 M phosphate buffer of pH7.4. 0.3cc of alkali medium contained 10% sodium chloride.

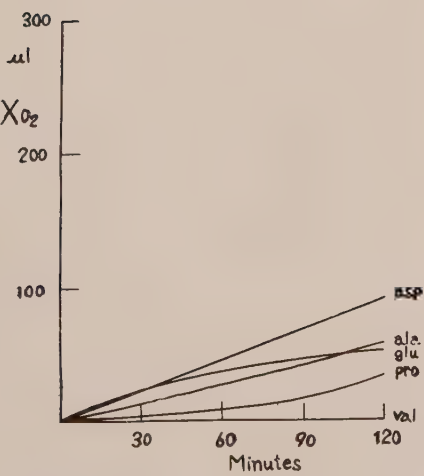


Fig. 2 Effects of the presence of 5% sodium chloride in the reaction system on the velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Bac. subtilis* sp. which grown in agar-agar

こゝでは *Bac. subtilis* sp. の各種アミノ酸酸化能に対する食塩の影響及び食塩に対する適応性についてWarburg 検圧計で定量的に測定した。食塩を含む培地で培養した場合と普通 agar-agar 培地で培養した場合のアミノ酸酸化酵素の活性を比較するために，10% NaCl を含む培地で培養した菌体の酵素活性を測定した結果を Fig. 1 に図示した。即ち L-aspartic acid 及び L-glutamic acid に対する酸化能は普通agar-agar培地で発育した菌体に比しあまり変化がないが酸化酵素系形成は少し阻害されている。Alanine に対する酸化能は前二者に比し阻害度大であるが生成された酵素の全量はあまり変化ない。L-proline 及び DL-valine に対しては約50分及び20分の lag phase 後酵素が形成されている。特に proline に対する酸化酵素の形成量は非常に少くなつている。普通 agar-agar 培地で培養した菌の浮遊液で基質中に5% NaCl を含有させた場合の酸化能及びアミノ酸酸化酵素系の形成を測定した結果を Fig. 2 に図示した。即ちいずれの基質に対しても反応液中に5% NaCl を含有すれば酵素活性及び酵素系形成は著明に阻害された。

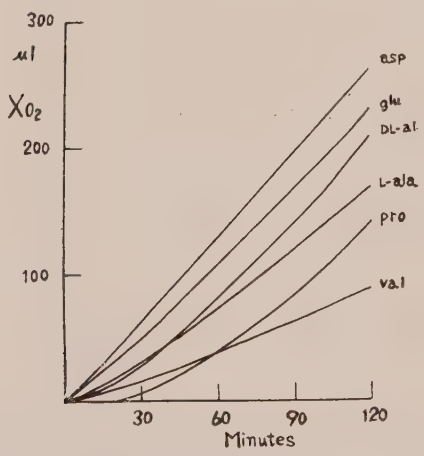


Fig. 3 Effects of the presence of 5% sodium chloride in the reaction system on the velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Bac. subtilis* sp. which grown in agar-agar contained 10 per cent of sodium chloride

次に10%NaClを含む agar-agar 培地で培養した菌体で基質中に7%及び10%NaClを含有させた場合は酵素活性は非常に阻害された。更に高濃度の NaCl を含有する培地に発育した菌体でも反応系中に7%以上のNaClが存在すると酵素活性及び酵素形成は著しく阻害された。

3) 酵素の安定度

Bac. subtilis sp. の菌浮遊液を5°で12時間,30°で2, 4及び6時間放置した場合の安定度を測定した結果をTable 2に表示した。酵素の安定度は菌浮遊液を調製した時直ちに酵素活性を測定し反応後60分に消費する酸素の総量を100とした場合の酵素活性減少を%で表わした。

Table 1. Effect of various reagents on activity of enzyme

Reagent	Final concent.	Inhibition per cent					
		Auto-resp.	Glutamic acid	Asprtic acid	Alanine	Proline	Glycine
Methylene blue	10^{-2}M	74	94	100	94	92	—
	10^{-3}M	51	82	86	76	—	—
	10^{-4}M	31	56	77	47	—	—
Azide	10^{-2}M	68	80	95	84	31	—
	10^{-3}M	10	34	35	30	stimu.	—
	10^{-4}M	stimu.	12	33	10		—
Sodium dehydro-acetate	10^{-2}M	70	92	92	87	100	—
	10^{-3}M	66	80	95	—	—	—
	10^{-4}M	27	56	41	45	—	—
2,4-dinitrophenol	10^{-3}M	stimu.	74	100	91	stimu.	50
	10^{-4}M	stimu.	stimu.	—	stimu.	stimu.	46
	10^{-5}M	stimu.	stimu.	15	stimu.	stimu.	43
KCN	10^{-3}M	13	100	90	96	38	100
	10^{-4}M	0	stimu.	29	stimu.	stimu.	35
	10^{-5}M	0	stimu.	stimu.	stimu.	stimu.	5
Crystal violet	10^{-4}M	100	100	91	100	100	100
	10^{-5}M	84	93	46	60	100	56
	10^{-6}M	6	stimu.	0	stimu.	100	30

Table 2. Lost per cent of its activity on stored cell suspensions

substrate	12 hours at 5°C	2 hours at 30°C	4 hours	6 hours
L-aspartic acid	98	36	100	100
L-glutamic acid	71	40	41	71
DL-alanine	80	48	75	100
L-proline	50	0	54	100
L-leucine	—	50	90	100
L-arginine	33	0	0	—

考　　察

呼吸においては，2, 4-dinitrophenol をはじめとする数種の phenol 置換体，NaN_3, methylene blue その他の色素類，グラミヂンやオーレオマイシンなどの抗生物質，ウスニン酸の如き地衣成分などが mitochondria の呼吸作用を阻害しない濃度で oxidative phosphorylation を阻害することが報告されている。この機構については不明であつたが，Loomis & Lipmann[3], Cross, Taggart, Covo & Green[4] 等が 2, 4-dinitrophenol は酸化的燐酸エステル化に対する典型的な "uncoupling agent" である事を発見し，次第にこの機構が明らかになつて来た。即ち 2, 4-dinitrophenol は呼吸を阻害しないで adenosine triphosphate（ATP）の生成を阻害するというのである。所が 2, 4-dinitrophenol は呼吸を阻害しないのみでなく，或る濃度範囲ではかえつて呼吸を促進する作用があるので，この呼吸促進機構については又不明になつた。最近になつて Potter & Recknagel[5], Lardy & Wellman[6,7]らは弱い ATPase 活性を有する肝臓 mitochondria を注意深く調製し，この mitochondria は phosphate-acceptor 系が存在しないと呼吸は弱いが，phosphate-acceptor 系或は dinitrophenol を加えると著しく呼吸作用が増大すると述べている。

著者の実験結果でも 10^{-3}M ～ 10^{-5}M の濃度範囲で呼吸は促進されるが，10^{-3}M 濃度で glutamic acid, aspartic acid 及び alanine に対する酸化が強く阻害された。即ち有機燐酸エステルがこの酵素作用及び 10^{-3}M 濃度で酸化が促進されているが恐らくもう少し高濃度では阻害されると思われる。

Azide の作用については，Spiegelman[8)-11)]等によつて，このものが低濃度（2.5×10^{-3}M）で解糖を阻害せず，無機燐酸のエステル化のみを著しく阻害することが報告されている。著者の実験結果では 10^{-2}M及び 10^{-3}M濃度で呼吸作用は68%及び10%阻害されるが，10^{-4}Mでは呼吸作用は促進されている。Glutamic acid, aspartic acid 及びalanine に対する酸化は 10^{-2}M濃度で強く阻害されている。

Crystal violet の作用様式について，Gale[12] は Gram 陽性菌における glutamic acid の細胞膜透過や細胞内代謝の様な "energy-linked" な過程の crystal violet による阻害が 2, 4-dinitrophenol や azide による阻害と全く同一の様式で行なわれる事を発見している。著者の実験結果では 10^{-4}M の様な低濃度においてすら呼吸作用も各アミノ酸に対する酸化作用も共に強く阻害された。

Dehydroacetic acid は微生物の生育を強く阻害する事が知られているが，Table 1 に示したように呼吸作用もアミノ酸酸化酵素の活性をも強く阻害する。

Methylene blue は dehydroacetic acid とほゞ同程度に呼吸作用も，アミノ酸酸化酵素の活性を阻害する。

CN に対しても 10^{-3}M濃度でアミノ酸酸化酵素は強く阻害された。

以上の諸実験は菌浮遊液による実験であるので之等阻害剤に対する影響も複合酵素系に対する挙動であり之等の実験からL-アミノ酸酸化酵素の基質に対する特異性について明確な区別をなし得なかつた。

細菌によるアミノ酸の酸化は基質であるアミノ酸が高濃度の食塩溶液中にある時は，普通細菌である時は勿論，耐塩性細菌による場合もその作用は微弱であり，又アミノ酸酸化酵素の形成も著しく阻害される。

著者は前に報告した様に *Bac. subtilis* の蛋白質分解酵素は食塩に対して適応し，高濃度の食塩を含有する基質に対しても活性が大である。塩辛の熟成中 monoamino-N 量は塩辛調製後12日位まで対数的に増加し12日より20日目位まで殆んど一定，20日目以後又増加している。塩辛の熟成中における細菌数は16～19日位迄細菌の増殖が緩慢でありあまり増加しないが19日以後増殖速度は急激に増大し，調製後26日位にて生存する細菌数は最大となる事を報告した。そうすると20日以後に増加する monoamino 酸は耐塩細菌によつて酸化的脱アミノを受け消失する事が少く，むしろこの時期から細菌の蛋白質分解酵素によつて生成されるアミノ酸が増加しているものであろう。

然しながら著者は食塩に対する影響からもアミノ酸酸化酵素の基質に対する特異性を明確に区別し得なかつた。

又 L-アミノ酸酸化酵素の安定度からは Green 等の実験の様にかなり基質に対して安定度を異にする事が

わかり，恐らく数種の基質に対して特異性を有する酵素の混合されている事が推定出来る。

要　　約

1) 2, 4-dinitrophenol の10^{-3}M～10^{-5}M の濃度範囲で呼吸は促進されるが，10^{-3}M 濃度でアミノ酸酸化酵素は強く阻害される。即ち有機燐酸エステルかこの酵素作用及び酵素系形成に重要な役割を演じている事を示している。Azide では10^{-2}M濃度で酸化能は強く阻害される。Crystal violet では10^{-4}M のような低濃度においてすら呼吸作用もアミノ酸に対する酸化作用も共に阻害される。Dehydroacetic acid によつて呼吸作用もアミノ酸酸化作用も強く阻害される。Methylene blue, CN でも強く阻害される。以上の諸結果は複合酵素系に対する挙動であり，基質に対する特異性について明確な区別をなし得なかつた。

2) 細菌によるアミノ酸の酸化は基質であるアミノ酸が高濃度の食塩溶液中にある時は酸化酵素能も酵素形成も著しく阻害される。

3) L-アミノ酸酸化酵素の安定度からは Green 等の実験結果のようにかなり基質に対して安定度を異にする恐らく基質に対して特異性を有する酵素が混合されている事が推定出来る。

文　　献

1) Krebs, H. A. (1951). *Oxidation of amino acid.* The enzymes, **2** (1), 499 Sumner, J. B. & Myrback, K., Academic Press Inc. N. Y.

2) Stumpf, P. K. & Green, D. E. (1944). *J. Biol. Chem.* **153**, 387.

3) Loomis, W. F. & Lipmann, F. (1949). *Ibid.* **179**, 503.

4) Cross, R. T., Taggart, J. V., Covo, G. A. & Green, D. E. (1949). *Ibid.* **177**, 655.

5) Potter, V. R. & Recknagel, R. O. (1951). ***The regulation of the rate of oxidation in rat liver mitochondria.*** Phosphorus Metabolism, **1**, 377, Willam, D. M. & Bentley, G., The Johns Hopkins press, Baltemore.

6) Lardy, H. A. & Wellman, H. (1952). *J. Biol. Chem.* **195**, 215.

7) ———— & ———— (1953). *Ibid.* **201**, 357.

8) Spiegelman, S. (1947). *J. Celluar Comp. Physiol.* **30**, 315.

9) ———— & Reiner, J. M. (1947). *Ibid.* **30**, 347.

10) ———— & Kamen, M. B. & Sussman, M. (1948). *Arch. Biochem.* **18**, 409.

11) ———— & (1949). *Cold Spring Harbor Symp. Quan. Biol.* **11**, 34.

12) Gale, E. F. (1941). *Biochem. J.* **48**, 286.

イカ完全利用に関する研究

第12報　夏イカ肉と秋イカ肉の分解性の差異に関する研究

谷川英一・元広輝重・石子博敏・藤井豊・谷地健二郎
（北海道大学水産学部水産食品製造学教室）

Studies on the Complete Utilization of Squid (*Ommastrephes sloani pacificus*)

XII. On the difference of decomposable velocities of summer and autumn squid meat

Eiichi TANIKAWA, Terushige MOTOHIRO, Hirotoshi ISHIKO,
Yutaka FUJII and Kenjiro YACHI

Abstract

It has been said that there are differences in the qualities and decomposable velocities of dried-, frozen- or salted-squid made of summer squid (from June to August) or of autumn squid (from September to December). This may be due to the existence of different properties of the meat.

The authors have ascertained the differences in the rate of velocity of the falling of freshness, autolysis, histological aspect, chemical components, solubility, the amount of bound water of the both types of squid meat.

The authors have known that the difference of the decomposable velocities is due to the differences of the articles as above stated.

秋イカの塩辛は年越し出来るが夏イカの塩辛は年が越せないと俗間でいわれているように，夏イカと秋イカとではそれらを原料とした乾製品，塩蔵品，冷凍品等において品質の差異，貯蔵性の差異が認められており，又その原料においても分解性に差異がある事がいわれている。即ち夏イカ秋イカとではその肉質に差異がありそれによつて品質，貯蔵性に差異をもたらされると考えられる。著者等は両漁期におけるイカ肉の適当な貯蔵法を見出すため，先ずそれらの生肉の分解性に差異を生ずる理由を見出すべく種々の実験を行つたのでここに報告する。

I　夏イカ肉と秋イカ肉の初期鮮度低下速度の差異について

1. 試料及び実験方法

陸揚げされた直後の新鮮な夏イカ（8月中旬漁獲）と秋イカ（10月中旬）を時期別にそれぞれ用い内臓，頭脚部を除去後，これをスルメ製造の時のように開いて洗滌し，試料とし，35°C，25°C，10°C の3種の温度に放置した。それぞれ放置後一定時間後毎に試料をとり出し，Homogenizer で均質にし，揮発性塩基窒素量（V. B.-N）を測定し，各放置温度における放置時間と V. B.-N 生成量との関係を求めた。

2. 実験結果

夏イカと秋イカについて，各放置温度における V.B.-N 生成量と放置時間との関係を図示すればFigs. 1, 2のようである。

Figs. 1 及び2において，著者等は魚介肉の加工処理において原料学の立場から一般にいわれている初期

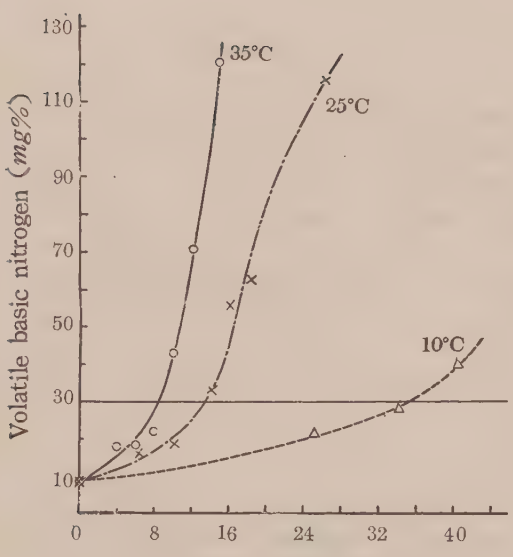


Fig. 1. Relation between the storing time and the amount of volatile basic nitrogen at various temperatures (summer squid)

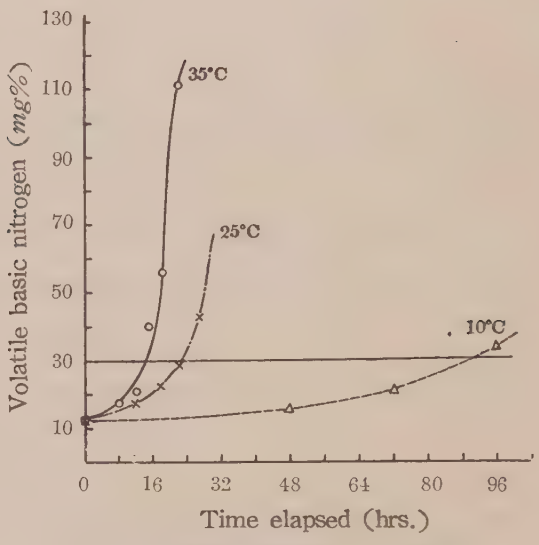


Fig. 2. Relation between the storing time and the amount of volatile basic nitrogen at various temperatures (autumn squid)

腐敗点である V. B.-N 量が 30*mg%* に達するまでの放置時間と V. B.-N 生成量との関係に注目し，その点に達するまでは大体抛物線を示しているものとして，次式により初期鮮度低下速度係数（*P*）を求めた。

$V=Pt^2+b$……(1)　　但し *V*: V.B.-N量(*mg%*)，　　*t*: 放置時間，　　*b*: 常数（この場合放置時間0の時の V. B.-N量）

なお，*P*は次式の如く温度（*t*）の函数として表わされる。　　$P=kt$……(2)　　但し *k*: 常数

ここで Figs. 1 及び2により V. B.-N量が 30*mg%*に達するに要する時間を求め，それ等の値を（1）式に代入すると Table 1 のような*P*の値が得られる。

Table 1. Velocity rates of falling of freshness "*P*" in summer and autumn squid

Temp. (°C) / Sample	35°C	25°C	10°C
Summer squid	0.412	0.132	0.029
Autumn squid	0.082	0.031	0.003

以上のように得られた結果から考えるのに，先ず Figs. 1及び2より夏イカ肉及び秋イカ肉の分解速度に差異があり，夏イカ肉の方が各温度において秋イカ肉よりも速かに 30*mg%*の点に到達する事からみて，夏イカ肉が秋イカ肉に比して速かに分解する事がわかる。更に Table 1をみるのに*P*の値は夏イカ肉の方が秋イカ肉に比して何れの温度においても大きい値をとる事がわかる。

なお，Fig. 3 は Table 1 の*P*の値を（2）式に代入して得られ，温度（*t*°C）と初期鮮度低下速度係数*P*と

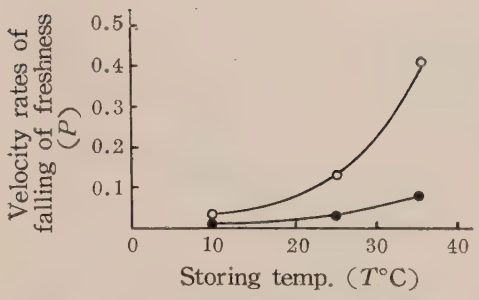


Fig. 3. Comparison of summer and autumn squid in relations between the velocity rates of the falling of freshness, P, and storing temperature T

の関係を示したものである。即ち夏イカ肉及び秋イカ肉ともに低温においてはPの値が小さく，温度が上昇するに従いともに増大している。しかしその増大の速度は夏イカの方が秋イカ肉より遙かに著しい。即ち放置温度が高温になるに従い，初期鮮度低下の速度は夏イカ肉の方が速かになつている。

以上の実験結果から，同一種のスルメイカでありながら，夏イカと秋イカとで単に漁獲時期が異るという事から前記のようにその肉の初期鮮度低下速度に著しい差異が生ずるのは肉質の差異によるのではないかと考えられる。

Ⅱ　夏イカと秋イカの自家消化速度の差異について

夏イカと秋イカ肉の初期鮮度低下速度に差異のある事を前項において示したが，初期鮮度の低下は初め自家消化により後は細菌との共同作用により行われるものと考えられるので，ここでは主として自家消化速度の差異を見出すために両漁期のイカ肉について比較した。

1．試料及び実験方法

夏イカ（8月中旬）及び秋イカ（10月中旬）を試料とし，それぞれ別々の時期に内臓及び頭脚部を除去し手で剝皮し，Homogenizerにかけて均質化し，その250gを蒸溜水1l中に懸濁せしめ，綿布で裏漉し，これに防腐剤としてクロロホルム15cc，トルオール100ccを添加し，更に水を添加して1.5lとし供試料とした。先ず至適pHを知るため，上記供試料を三角フラスコに150～200cc宛分注し，之を$^N/_{10}$ HCl溶液及び$^N/_{10}$ NaOH溶液で各種pH値に調節を行つて定温に放置し，又至適温度を知るためには47°C，37°C，室温及び氷蔵庫（9°C）内に放置し，これらの試料10ccをとり，これに三塩化醋酸10ccを加えて除蛋白し，その濾液5ccずつについてアミノ酸態窒素（Van Slyke法）と全窒素量を測定した。

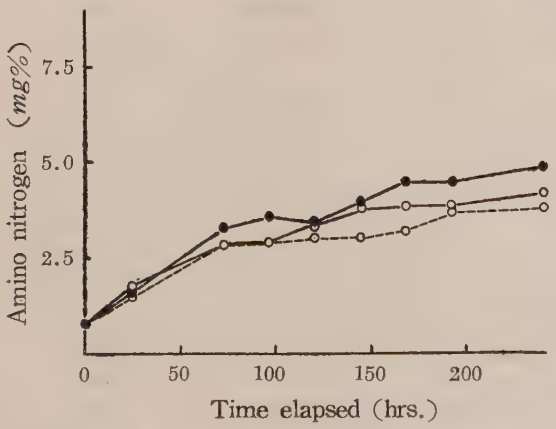


Fig. 4. Opt. pH in autolytic decomposition of summer squid

—●— pH 6.1　—○— pH 6.4　--○-- pH 5.9

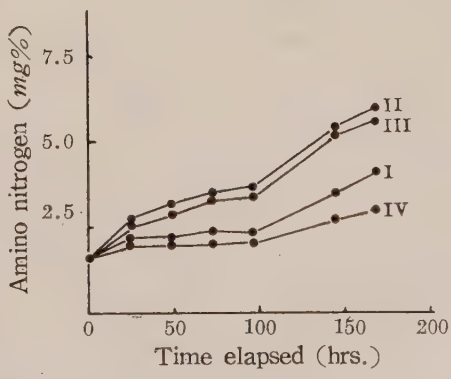


Fig. 5. Opt. temp. in autolytic decomposition of summer squid

Ⅰ. 47°C　Ⅱ. 37°C
Ⅲ. 27°C　Ⅳ. 9°C

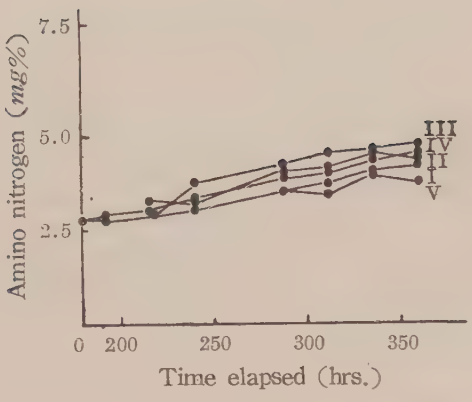


Fig. 6. Opt. pH in autolytic decomposition of autumn squid

Ⅰ. pH 5.5 Ⅱ. pH 5.2 Ⅲ. pH 4.8
Ⅳ. pH 4.2 Ⅴ. pH 3.8

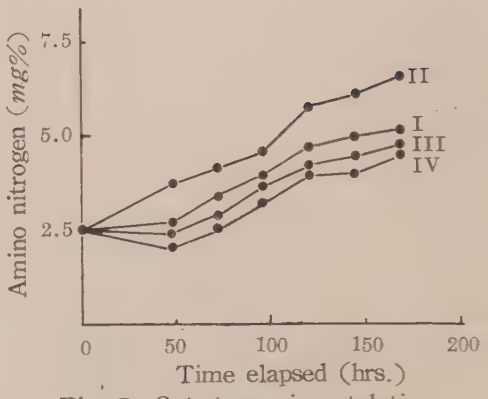


Fig. 7. Opt. temp. in autolytic decomposition of autumn squid

Ⅰ. 47°C Ⅱ. 37°C
Ⅲ. 15° ± 5°C Ⅳ. 9°C

2. 実 驗 結 果

Figs. 4, 5はそれぞれ夏イカ肉の自家消化酵素の至適pH及び至適温度を示し，Figs. 6, 7は秋イカ肉の自家消化酵素の至適pH及び至適温度を示したものである。即ち夏イカ及び秋イカ肉の自家消化酵素の至適pHはそれぞれ6.1及び4.8である。至適温度は何れの漁期のものも37°C附近である。次にTables 2, 3は夏イカ

Table 2. Autolytic decomposition velocity in summer squid (37°C)

Days	t	amino-N (*mg%*)	x	a−x	$1/t \cdot \log \frac{a}{a-x}$	$k \times 10^8 \times 0.4343$
0	0	1.6215	—	—	—	—
1	1440	2.7500	1.1285	4.9465	0.00005997	5997
2	2880	3.1750	1.5535	4.5215	0.00004413	4413
3	4320	3.5125	2.0910	3.9840	0.00004209	4209
4	5960	3.7875	2.1660	3.9090	0.00003193	3193
5	—	—	—	—	—	—
6	8640	5.4250	3.8035	2.2715	0.00004936	4936
7	10080	6.0750	4.4535	1.6215	0.00005682	5682

Table 3. The velocity of autolysis in autumn squid (37°C)

Days	t	amino-N (*mg%*)	x	a−x	$1/t \cdot \log \frac{a}{a-x}$	$k \times 10^8 \times 0.4343$
0	0	2.5245	—	—	—	—
2	2880	3.7166	1.1921	5.3451	0.00002998	2998
3	4320	4.1850	1.1105	4.8768	0.00002942	2942
4	5960	4.5746	2.0501	4.4871	0.00002707	2707
5	7200	5.6888	3.1643	3.3729	0.00003966	3966
6	8640	6.0390	3.5145	3.0227	0.00003870	3870
7	10080	6.5372	4.0127	2.5245	0.00004083	4083

及び秋イカ肉のそれら自家消化酵素の最適温度である37°Cにおける自家消化速度を示したものである。この表を見ても明らかなように夏イカ肉においては秋イカ肉よりも自家消化によりアミノ窒素の増加量も多く又その速度恒数も増加している。これを温度の低い9°Cの放置温度の場合における自家消化によるアミノ窒素の増加量と自家消化速度係数の増加をみても（Table 4, 5）同じようである。これらの実験結果からみる

Table 4. The velocity of autolysis in summer squid (9°C)

Days	t	amino-N (mg%)	x	a-x	$1/t \cdot \log\frac{a}{a-x}$	$k\times10^8\times0.4343$
0	0	1.6215	—	—	—	—
1	1440	1.9875	0.3660	2.6465	0.00003686	3686
2	2880	1.9875	0.3660	2.6465	0.00001975	1975
3	4320	2.0500	0.4385	2.5740	0.00001578	1578
4	5960	2.0625	0.4410	2.5715	0.00001144	1144
5	—	—	—	—	—	—
6	8640	2.8125	1.1910	1.8215	0.00002517	2517
7	10080	3.0125	1.3910	1.6215	0.00002650	2650

Table 5. The velocity of autolysis in autumn squid (9°C)

Days	t	amino-N (mg%)	x	a-x	$1/t \cdot \log\frac{a}{a-x}$	$k\times10^8\times0.4343$
0	0	2.5245	—	—	—	—
2	2880	2.0336	—	—	—	—
3	4320	2.4975	—	—	—	—
4	5960	3.1884	0.6639	3.7401	0.00001144	1144
5	7200	3.8850	1.3605	3.0435	0.00002199	2199
6	8640	3.9009	1.3764	3.0276	0.00001867	1867
7	10080	4.4040	1.8795	2.5245	0.00002386	2386

に夏イカが秋イカより速かに自家消化しやすいことがわかる。なお両漁期のイカの自家消化速度を他魚種のそれ[1]と比較するにイカ肉はかなりその自家消化速度の速いことがわかる。これはイカ肉が他の魚種に比し速かにアルカリ性になり腐敗し易く[2/3]なると考えられる。なお夏イカと秋イカの自家消化速度の差異についてはイカ肉のpH値は新鮮時には6.0附近にあり腐敗に至るにしたがつて8.0附近まで上昇するが（夏イカについては大島[4]，秋イカについては著者等の研究結果）この新鮮時のイカ肉のpHは夏イカ肉の自家消化酵素の至適pHに極めて近いが，秋イカ肉の至適pHよりは離れている。即ち夏イカは新鮮時において既に自家消化しやすい条件にあると考えられ，秋イカの場合は或る程度分解が進みpHがいくらか上昇したときに初めてその自家消化酵素の至適pH値に近くなるためその自家消化も夏イカに比し遅れることになる。即ち自家消化酵素の至適pHの差異が自家消化速度の差異に著しい関係をもつものである。夏イカ及び秋イカにおける自家消化速度の著しい差異は腐敗作用にも影響を及ぼすことは前項の実験結果と併せ考えても明らかである。

Ⅲ　夏イカ肉と秋イカ肉の組織の差異

夏イカ肉と秋イカ肉とにおいて，その初期鮮度低下速度が異り，その差異は恐らく両漁期のイカの肉質の差異によるものであろうと考えたが，こゝでは両漁期のイカに組織学的な差異があるかどうかを知るため，それぞれの組織切片を作り検鏡比較した。なおイカの組織学的研究には田中[5]の報告があり，同氏は位相差

顕微鏡により，日本海産冬イカの組織を観察した。

1. 試料の調製及び標本作製*

夏イカ及び秋イカともに，それぞれ漁船より陸揚げされた直後の極く新鮮なイカ肉を原料とし，その胴部から肉片（0.5×0.5×1.0cm^3）を切りとり，これを試料とした。これら肉片をそれぞれ直ちに Bouin 溶液中に投入し，約2時間浸漬後とり出し，70%アルコール溶液中に入れ，以後順次80，90，95%，無水アルコールに各30分間ずつ浸漬し，脱水を行つた。次にクレオソート：トルエン（1：1）混液で1時間処理後更にトルエンで30分間，トルエン：パラフィン（5：5）の混合液で1時間処理した。このように固定した切片肉

Fig. 8. Microphotograph of the tissue in summer squid (×280)

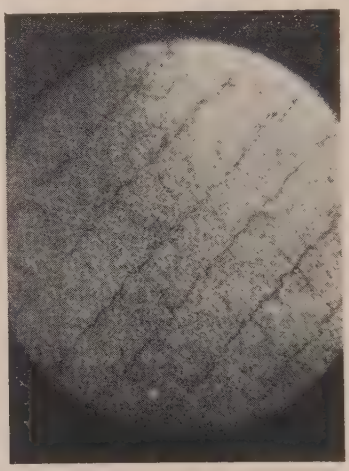


Fig. 9. Microphotograph of the tissue in summer squid (×280)

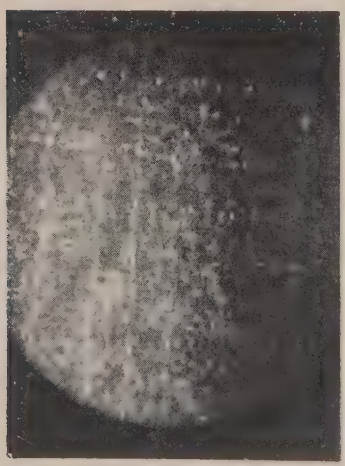


Fig. 10. Microphotograph of the tissue in autumn squid (×280)

Fig. 11. Microphotograph of the tissue in autumn squid (×280)

* 試料の調製及び標本作製には本学新山助教授に負う所大である。

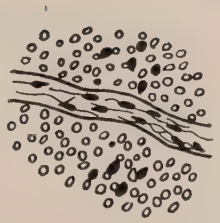


Fig. 12. Model figure of the tissue of summer squid

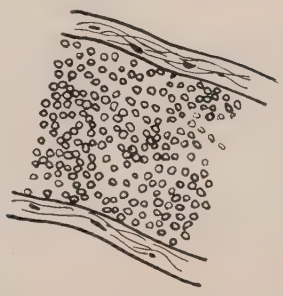


Fig. 13. Model figure of the tissue of autumn squid

をミクロトームで 10μ（又は 15μ）の薄片に切断し，染色のために各切片をスライドグラス上に拡げ固定した。固定切片は Delafield Haematoxylin 溶液で90分間染色後，流水で20分間洗滌した。次に染色した切片は酸・アルコール液で脱色，エオシン・アルコール溶液に1分間浸漬し，70，90，94%及び無水アルコールでそれぞれ洗滌後，クレオソート・キシレン（2：8）混合液で処理し，更にキシレンで処理し，永久標本を作製した。

2. 検鏡観察

検鏡写真（280倍）は Figs. 8，9（夏イカ肉），Figs. 10，11（秋イカ肉）に示す如くである。更に 600倍に拡大した模型図は Fig. 12（夏イカ肉）及び Fig. 13（秋イカ肉）の如くである。

Figs. 12及び13を比較するに，夏イカ肉と秋イカ肉との間の差異は判然とあらわれている。即ち夏イカ肉にあつては筋繊維が非常に疎であるのに対し，秋イカ肉では非常に密であつて，互に捩れながら結合している。即ち夏イカ肉では組織に間隙が著しく多いのに対し，秋イカ肉では間隙が少く，且つその筋繊維の太さも夏イカ肉より太いようである。前述の筋繊維間の間隙は切片標本作製中脱水により生じたものであるが，生肉にあつてはこの間隙に水，体液又は筋繊維を取り巻く結締組織等で充満しているものと考えられる。即ち夏イカ肉の繊維間の間隙中に水，体液の多量に存在すること，並びに繊維の細いこと等は自家消化による分解を速かにし，又細菌の繁殖に好培地を与えるものと思われ，これ等の点並びにそこに存在する後述の結合水について併せ考えてみても，夏イカ肉に比し初期の鮮度低下並びに腐敗の速いことが首肯される。

Ⅳ　夏イカ及び秋イカ肉の一般成分とエキス成分の比較

夏イカと秋イカ肉がその初期の鮮度低下速度及び腐敗速度において，差異のある原因として筋肉の組織学的な差異と共に一般成分とエキス成分の差異が考えられるので著者等はそれ等について一応実験を行つた。

1. 試料及び実験方法

陸揚げ直後の新鮮な夏イカ（7月下旬）及び秋イカ（10月中旬）をそれぞれ別々の時期に原料とし，内臓と頭脚部を除去後，剝皮したものを Homogenizer で均質化し，一般成分測定の試料とした。又エキス成分の測定には前記試料を温水（45°～50°C）で1時間時々攪拌しつゝ抽出し，抽出液に三塩化酢酸を添加して除蛋白し，その濾液を用い，全窒素量，アミノ酸態窒素量の測定を行つた。なお粗脂肪の測定は Soxhlet の脂肪抽出器を使用し，全窒素量は Kjeldahl 法によりアミノ酸態窒素量の測定は Van Slyke 法によつた。

2. 実験結果

実験結果は Tables 6，7 の如くである。

Table 6 よりみるに，水分量は夏イカ肉は 79.37%，秋イカは 75.85%であつて，秋イカは夏イカよりも水分がやゝ少ない。又粗蛋白及び純蛋白では各々秋イカ肉が夏イカより約3%程度多く，灰分，脂肪では約

Table 6. Comparison of chemical components of summer and autumn squid

Components \ Researcher / Sample	Hokkaido Fisheries Experimental Station		Authors	
	Summer squid	Autumn squid	Summer squid	Autumn squid
	(%)	(%)	(%)	(%)
Water	77.98	76.64	79.37	75.85
Dry matter	22.02	22.36	20.63	24.15
Ash	(4.23)*	(6.55)*	1.39 (6.67)*	1.65 (6.76)*
Crude fat	(4.92)*	(5.01)*	1.22 (5.86)*	1.55 (6.36)*
Total-N	(13.10)*	(13.38)*	2.81 (13.49)*	3.27 (13.40)*
Crude protein	—	—	17.56	20.44
Pure-protein-N	—	—	2.58	2.88
Pure-protein	—	—	16.00	18.86

* In parentheses in Table 6, the values are expressed as per cent of the dried material.

Table 7. Comparison of components in the meat extracted juice of summer and autumn squid

Components \ Sample	Summer squid	Autumn squid
	(%)	(%)
Total-extracts-N	0.905	0.958
Amino-N in extracts	0.082	0.085

0.3% 程度秋イカ肉が夏イカ肉に比して多い。乾物に対する百分率では脂肪量は秋イカ肉の方が約 1.5% 多い。北水試[6] が行つた実験結果においては夏イカ肉と秋イカ肉とではその脂肪含量及び水分量に多少の差はみているがその他の成分についてはあまり差異をみていない。

Table 7 よりみるに，エキス成分の比較では全エキス窒素及びエキス中のアミノ酸態窒素の何れも秋イカ肉が夏イカ肉に比して多少大きい値を示しているが，特に著しい差異はみられない。スルメイカ肉のエキス成分については既に吉村[7] 等の研究があり，その窒素形態を検しているが，これによれば全エキス量は夏イカ肉が秋イカ肉に比して幾分多く，両漁獲期のイカ肉共にエキス中に溶出する窒素量はアミノ酸以外の形態の窒素が多いことをみ，これはアミン，プーリン塩基，ベタイン等に由来する如く推定している。しかもこれ等成分中には何等の重要な差異を認められなかつた。

秋イカ肉が夏イカ肉に比べ一般に肉質が厚く，その形態も大きくなつていることは一般に認められているところであるが，これは生物学的にみて成長度の差異によるものと考えられる。鮮肉としてみれば，明らかに秋イカ肉は夏イカ肉に比して水分が少なく，脂肪，灰分，蛋白質含量に富んでいる。この事実のみでは簡単に夏イカ肉が秋イカ肉に比べて細菌により分解し易いとはいえないが，前項の組織学的の観察結果と併せ考えれば夏イカ肉が細菌により分解し易い肉質の状態又は成分分布を持つていることが考えられる。

V 夏イカと秋イカ肉蛋白の溶解度の差異

夏イカと秋イカとではその肉の厚さも異なり，且つ組織学的にも差異のあることをみたが，更にこゝでは

肉蛋白の性質の差異をみるため，両漁獲期のイカ肉蛋白の溶解度を検討した。

1. 試料及び実験方法

陸揚げ直後の夏イカ（7月下旬）及び秋イカ（10月下旬）肉を用い，それぞれ別々の時期に内臓及び頭脚部を除去し，手で剝皮したものを，（A）試料：Homogenizer で均質化したもの，（B）試料：厚さの殆んど等しい部分を約 $(2cm)^2$ ずつに切りとつたものの2種とし，これらの中（A）試料は約5 gずつをとり，（B）試料はその1ケずつを試料とし，それら試料を別々に蒸溜水及び各種濃度の HCl, CH_3COOH, NaOH 溶液の各50 cc ずつに投入し，時々攪拌し，（A）試料は2時間，（B）試料は24時間夫々放置後，遠心分離又は濾過してその一定量中の溶出窒素量を定量し，イカ肉全窒素量に対する百分率で溶解度を表わした。なお試料の放置温度は30°，10° 及び5°C とし，溶媒の濃度は HCl, CH_3COOH, NaOH は夫々0.1N, NaCl は0.5N の濃度とした。本実験において試料を（A）（B）の如く2種としたのは試料の状態が異つた場合溶解状態に差異あるか否かを検討するためであり，放置時間を前記の如く（A）試料では2時間，（B）試料では24時間としたのは前者は五十嵐，北林[8]等により，後者は岡田[9]等により，それら時間によりその溶解度が略々一定となることが既に認められているからである。

更に鮮度低下の際における溶解度を比較するため，イカ肉の揮発性塩基窒素量がそれぞれ 6～10 $mg\%$，15～20 $mg\%$，25～30 $mg\%$ 範囲の鮮度のものについて前記（B）試料を取扱つたと同じ方法で溶解度をみた。

2. 実 験 結 果

実験結果は Tables 8, 9, 10 に示すとおりである。これらの表よりみられるように，（A）試料の場合でも，（B）試料の場合でも，又各溶媒並びに各放置温度の場合とも，何れも一二の例外を除けば全般に夏イカ肉の溶解度が秋イカ肉のそれに比べて大きい値を示している。放置温度についてみるに，夏イカ，秋イカ

Table 8. The solubility of summer and autumn squid (sample A)

Solvent \ Temp.(°C) / Sample		30°C		10°C		5°C	
		Summer squid	Autumn squid	Summer squid	Autumn squid	Summer squid	Autumn squid
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
HCl	0.1N	60.8	58.2	60.7	55.4	51.0	50.0
CH_3COOH	0.1N	64.0	54.9	63.2	52.1	60.7	51.6
NaOH	0.1N	91.5	88.4	72.5	65.2	63.3	61.3
NaCl	0.5N	73.8	72.1	69.6	59.2	56.2	53.7
H_2O		42.7	42.3	42.2	41.6	41.8	40.2

Table 9. The solubility of summer and autumn squid meat (sample B)

Solvent \ Temp.(°C) / Sample		30°C		10°C		5°C	
		Summer squid	Autumn squid	Summer squid	Autumn squid	Summer squid	Autumn squid
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
HCl	0.1N	33.2	31.6	27.9	25.0	24.9	22.9
CH_3COOH	0.1N	41.4	33.4	27.1	24.4	26.2	17.5
NaOH	0.1N	—	40.7	46.4	37.0	40.9	31.9
NaCl	0.5N	45.4	28.3	24.1	22.3	19.3	19.3
H_2O		47.4	33.4	29.6	26.8	24.9	22.3

Table 10. The solubility of summer and autumn squid with various degrees of freshness

Solvent \ Temp.(°C) / Freshness(V.B-N) / Sample		30°C			5～10°C			
		6～10 mg%	15～20 mg%	25～30 mg%	6～10 mg% 10°C	6～10 mg% 5°C	15～20 mg%	25～30 mg%
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
HCl 0.1N	Summer squid	33.2	47.4	46.1	27.9	24.9	48.6	51.7
	Autumn squid	31.6	34.1	38.3	25.0	22.9	25.9	26.0
CH_3COOH 0.1N	Summer squid	41.4	45.2	43.6	27.1	26.2	35.5	42.4
	Autumn squid	33.4	39.7	40.3	24.4	17.5	19.9	30.7
NaOH 0.1N	Summer squid	—	—	61.2	46.4	41.0	56.7	60.1
	Autumn squid	40.7	47.2	41.3	37.0	31.9	33.4	40.0
NaCl 0.5N	Summer squid	45.4	47.7	48.6	24.1	19.3	39.9	38.6
	Autumn squid	28.3	34.1	37.0	22.3	19.3	25.5	27.3

肉ともに高温になるに従つてその溶解度が増大している。試料の差をみるに，（A），（B）試料の間では夏イカ，秋イカ肉ともに（A）試料の方が著しく大きい値を示している。溶媒の種類の差をみるに NaOH の溶解度が最も高く，HCl，CH_3COOH が比較的低い値となつているが，これは酸が各試料に対して肉蛋白を凝固せしめるのに対し，NaOH は加水分解的に作用することに原因すると思われる。なお（A）試料の場合では NaCl による溶解度が蒸溜水のそれより遙かに大であるのに対し，（B）試料においては逆に蒸溜水による溶解度の方が NaCl のそれより多少大きい値を示す結果となつている。これは（A）試料では NaCl による溶解度が大きいのは蒸溜水による溶解のほかに食塩可溶性蛋白の溶解が考えられるためであり，（B）試料の場合は魚肉の塩蔵時に認められるような変性，凝固塩析等の現象による魚肉表面の硬化によつて前記のようなことが起るのだろうと考えられる。NaCl のみでなく，HCl，CH_3COOH 等による溶解度も（B）試料の場合には蒸溜水のそれに比して低い値を示していることも前述のような理由と考えられる。

鮮度低下の場合は細菌による蛋白その他の高分子物質の分解をはじめ，蛋白の変性等に起因する蛋白分子間の結合力の弱体化等によつて溶解度の増大が考えられるが，Table 10 に示すように全般的に各種溶媒に対するイカ肉の溶解度は鮮度低下とともに著しく増大の傾向を示している。夏イカ肉と秋イカ肉の溶解度の差についてみるに，一二の例外を除くと鮮度が低下し V. B. -N が 15～20*mg%* となつた場合よりも，更に鮮度が低下し，V. B. -N が 20～30*mg%* になつた場合の方が両者が差が却つて多少小さい結果となつている。これは前に述べたように秋イカ肉の分解の進行が夏イカ肉のそれに比して遅いことによるものと考えられるのである。

右田[10]等はスルメイカの肉は他の魚肉に比較して水に溶け易いとし，これをスルメイカ肉の一特性としているが，一般に魚肉の溶解度が大きいということ，即ち水に溶け易いということはその肉質の構成分が蛋白のような親水性コロイドであれば，これが水に入ると各分子間結合が弱まり，却つて水との親和力が強くなり，遂には溶解状態になるという性質の強いことを意味していると考えられる。したがつて夏イカと秋イカ肉において，その溶解度に差異があることは漁獲時期の異るイカ肉蛋白構成様式又はその結合力が異つており，夏イカ肉蛋白は秋イカ肉蛋白に比して蛋白分子間の結合力が弱く，且つ水と結びつき易い状態にあるものと考えられる。これは後述の結合水の実験結果からも考えられる。以上のように考察すれば細菌による分解も夏イカが秋イカ肉に比較して速かであることも理解できると思われる。

Ⅵ 夏イカ及び秋イカ肉の結合水について

蛋白質が本来の状態を保持し一定の性質を示すための安定した分子構造を保つためには水が必要である。結合水の意義もこゝにあるものと考えられる。夏イカ肉及び秋イカ肉が細菌による分解速度において，又その溶解度において差異を示す以上含有する結合水の量及びその筋肉蛋白と筋肉中の水との結合力等においてもそれぞれ差異を示すものと考えられるので，コロイド化学的又は分子論的観点から両漁獲期のイカ肉の結合水量について蒸気圧法[1]を使用して実験を行つた。

1. 試料及び実験方法

陸揚げ直後の夏イカ肉及び秋イカ肉をそれぞれその漁期に採りそれらの胴部を用い手で剝皮したものを試料としその約2～3gの大きさの肉片をとり蒸気圧法によつて14°Cで含水量-関係蒸気圧曲線を求めた。

2. 実 験 結 果

Fig. 14は夏イカ及び秋イカ肉の夫々のg-P/P_0曲線を示したものである。但しgは乾物1gに対する水のg数，Pは測定温度t°Cにおける試料中の水の蒸気圧P_0は同一温度における純水の蒸気圧である。Fig. 14から明らかなように夏イカ肉の曲線と秋イカ肉の曲線とはP/P_0約0.6附近で交叉し，P/P_0が0.6以上の含水量範囲においては常に後者の曲線は前者の曲線の左側即ち下方に位置し，P/P_0が0.6以下の含水量範囲においては丁度逆の関係となつている。従来までの研究結果より結合水範囲と考えられるP/P_0は蛋白質の性質，測定温度，不純物等の存在によつて多少変化するが，大体0.5～0.7以下の範囲にあるといわれている。従つて上記の曲線関係は次に述べるような関係を示すものということが出来る。即ち結合水範囲（P/P_0 0.6附近以下）においては秋イカ肉は常に同一P/P_0値に対して夏イカ肉より高い含水量（結合水として）を示している。換言すれば秋イカ肉の結合水量は夏イカ肉のそれに比して大である。なお自由水範囲（P/P_0 0.6附近以上）においては逆に同一P/P_0値に対する含水量は夏イカ肉の方が秋イカ肉に対して大である。即ちFig. 14より秋イカ肉の結合水量は夏イカ肉に比して大であるということがわかる。結合水は細菌によつて自由水よりも利用され難いものであり[12]，このことから考えても秋イカ肉が夏イカ肉よりも細菌によつて利用され難く，従つて分解し難いと考えられるのである。

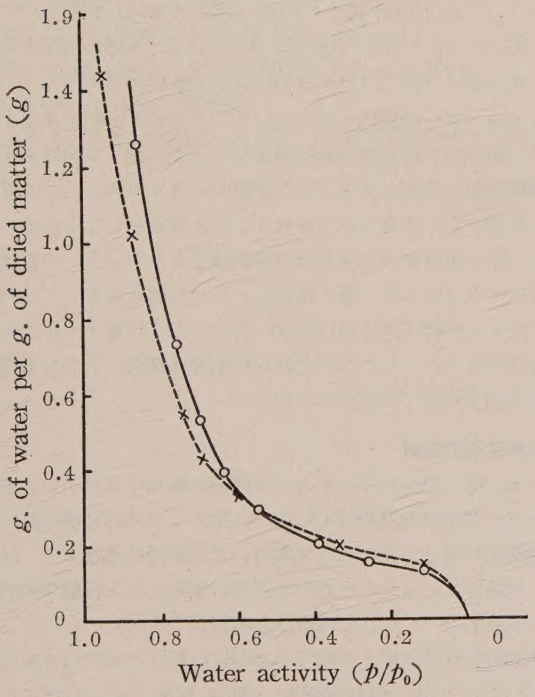


Fig. 14. Relation between water content (g) and relative vapour pressure (p/p_0) in summer and autumn squid
—○— Summer squid
--×-- Autumn squid

Fig. 15は次記のLewis and Randall[13]等の式により各P/P_0値に対する純水1 *Mol*当りの微分的自由エネルギーとの差$\Delta\bar{F}$を求め，同時にFig. 14より各P/P_0値に対応する含水量"g"を求め，この両者の関係からg-$\Delta\bar{F}$曲線を求めたものである。

$$\Delta\bar{F} = F_0 - F = -RT\ lnP/P_0 \cdots\cdots\cdots(1)$$

但しF_0はT°Kにおける純水1 *Mol*当りの微分的分子自由エネルギー，$\bar{F}$は同温度における試料中の水

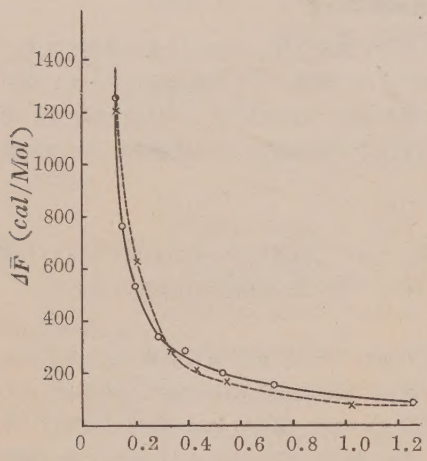


Fig. 15. Curves showing the relation "$g - \Delta\bar{F}$" of summer and autumn squid

—○— Summer squid
--×-- Autumn squid

1 *Mol* 当りの微分的分子自由エネルギー，R は瓦斯恒数（1.985 *cal*）である。

Fig. 15 より明らかな如く $\Delta\bar{F}$ の値が約 300*cal*/*Mol* 以下即ちこの $\Delta\bar{F}$ 値に対応する〝g〟の0.23附近以上の範囲において同一含水量〝g〟に対応する $\Delta\bar{F}$ の値は常に夏イカの方が秋イカに比して大きい値を示している。この同一含水量〝g〟に対応する $\Delta\bar{F}$ の値が大であるということは同一温度における試料中の水 1*Mol* 当りの微分的分子自由エネルギーが小さいことを意味しており，このことは水が他の物質との結合力にそのエネルギーを奪われている程度が強いことを示すものである。$\Delta\bar{F}$ の値が 300*cal*/*Mol* に相当する〝g〟値は約0.33であり，これは Fig. 14 より P/P_0 の値が約0.6に相当している。従つて $\Delta\bar{F}$ の値が 300 *cal*/*Mol* 以下の水即ち自由水範囲の水は夏イカ肉では秋イカ肉に比して他の力でもつてより強くエネルギー的制約を受けていることを示すものである。これは前項Ⅲの組織学的観察結果からみて，夏イカ肉はその筋繊維間隙が非常に大きくその間隙中に秋イカ肉に比して遙かに多量の水を含有するであろうことを想定せしめるものである。即ち前項Ⅳの一般成分の実験結果中水分において夏イカは秋イカに比しやゝ多く存在し，しかも結合水としてこの水が夏イカは秋イカに比し少ないということは夏イカがその自由水としての水を多量に含んでいることを示すものであり，したがつてそれら自由水は細菌によつても利用され分解を起し易く貯蔵性が小であるということが出来るのではなかろうか。

Ⅵ　綜合考察及び結論

夏イカ肉が秋イカ肉に比して何故貯蔵性が少ないか，即ち腐敗が早いかという問題を解明するために，先ず果して夏イカ肉が秋イカ肉より分解し易いか否かを，揮発性塩基窒素（V.B.-N）量をイカ肉の分解程度の指標として定量し，夏イカは秋イカに比しその初期鮮度が低下し易いことを確め，又自家消化速度もアミノ窒素の定量により前者の方が後者より大であることを知つた。そこでそれらの差異の原因につき組織学的観察，一般成分，肉の溶解度，結合水の量等について実験を行い，それらの差異を考察してみた。

先ず両漁期におけるイカ肉の自家消化酵素の至適 pH をみるに夏イカ肉では pH 6.1，秋イカ肉では 4.8 であつた。しかるにイカ肉の新鮮なるものにおいてはその肉の pH 値は両漁期とも略々 6.0 であつて夏イカ肉は新鮮時から既にその自家消化酵素の至適 pH に近く自家消化の始動速度も大きいと考えられる。したがつてこの点においても夏イカは秋イカより自家消化が促進されるのではないかと考えられる。

更に組織学的観察により，イカ肉腐敗細菌の対象となる筋肉組織の状態を考察するに，夏イカ肉の筋繊維の間隙が秋イカ肉のそれに比し疎であり，したがつてこの筋肉繊維間に抱合される物質，例えば体液，水分量は夏イカ肉が秋イカ肉より多いことが想定され，このことは一般成分において前者が後者より水分量の多いことからみても考えられる。次にこの筋肉組織中の結合水の実験結果から考えるに結合水としては秋イカ肉の方が夏イカ肉より多量に存在することを示し，したがつて夏イカ肉には細菌によつて利用され易い自由水が多量に存在することがわかる。又両漁期のイカ肉の溶解度をみるに夏イカ肉は秋イカ肉よりも溶解し易いことがわかつたがこれも細菌によつて夏イカ肉の方が秋イカ肉より分解され易い。したがつて貯蔵性が小さい理由となるのでなかろうか。以上のように夏イカ肉は秋イカ肉よりも分解され易い多くの因子をもつて

いることがわかつた。これらは恐らく洄游状態から考えて成長度の異る肉質のためであろう。

文　献

1) 大谷（1928）. 水産学会報 **15**（1）, 1.
2) 谷川. 未発表.
3) 清水・日引（1953）. 日水誌 **19**（8）, 877.
4) 大島（1927）. 札幌農林会報（85）, 1.
5) 田中（1955）. 蛋白研究班報告（3）, 51.
6) 五十嵐・北林（1954）. 同報告（3）, 4.
7) 吉村・久保（1953）. 北大水産彙報 **3**（3）, 205.
8) 五十嵐・其の他（1955）. 蛋白研究班報告（3）, 1.
9) 岡田・多田（1953）. 日水誌 **19**（3）, 28.
10) 右田（1953）. 同誌 **18**（10）, 558.
11) 秋場（1951）. 北大水産彙報 **1**（3,4）, 156.
12) ————. 未発表.
13) Levis & Randall (1923). *Thermodynamics* Chap. XXIII, p. 284.